

---

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abteilung Klinische Neuropharmakologie  
Fachgebiet für spezielle Zoologie der Technischen Universität München

# **Neuronale Netzwerke und deren Plastizität im Barrel-Kortex der Ratte**

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Anja Schierloh

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Hans-Rudolph Fries

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Hans-Joachim Leppelsack
2. apl. Prof. Dr. Walter Zieglgänsberger,  
Ludwig-Maximilian-Universität München

Die Dissertation wurde am 17.07.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 25.11.2003 angenommen.

---

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einleitung

- 1.1 Das somatosensorische System
  - 1.1.1 Der Tastsinn
  - 1.1.2 Die Sinushaare (Vibrissen) der Schnauzenregion
  - 1.1.3 Der somatosensorische Kortex
    - 1.1.3.1 Organisationsprinzipien des SI
    - 1.1.3.2 Der Fässchenkortex (Barrel-Kortex) der *Rodentia*
- 1.2 Gegenstand dieser Arbeit

### 2. Material und Methoden

- 2.1 Deprivierung somatosensorischer Informationen
- 2.2 Präparation thalamokortikaler Hirnschnitte
- 2.3 Visualisierung der Barrels
  - 2.3.1 Durchlicht-Hellfeldmikroskopie
  - 2.3.2 Dunkelfeldmikroskopie
- 2.4 Infrarotgelenkte Photostimulation
  - 2.4.1 Infrarot-Videomikroskopie
  - 2.4.2 Laser-Photostimulation
  - 2.4.3 Caged Substanzen
- 2.5 Elektrophysiologie
  - 2.5.1 Versuchsaufbau
  - 2.5.2 Ganzzelleableitung
  - 2.5.3 Pipetten
  - 2.5.4 Etablierung der Ganzzelleableitung
- 2.6 Intrinsisch optische Signale
  - 2.6.1 Visualisierung des IOS
  - 2.6.2 Versuchsaufbau
  - 2.6.3 Extrazelluläre Stimulation
- 2.7 Auswertung und Statistik

### 3. Ergebnisse

- 3.1 Eigenschaften neokortikaler Pyramidenneurone der Lamina 2/3 und 5
- 3.2 Synaptische Verschaltungen von Neuronen des Barrel-Kortex
  - 3.2.1 Somaspezifität der IR-gelenkten Photostimulation
  - 3.2.2 Topographische Kartierung von neuronalen Verbindungen auf Einzelzell-Ebene
  - 3.2.3 Die räumliche Verteilung präsynaptischer, inhibitorischer Neurone im Barrel-Kortex
  - 3.2.4 Auswirkungen sensorischer Deprivation auf die synaptischen Verschaltungen von Neuronen im Barrel-Kortex

- 
- 3.3 Neuronale Schaltkreise des Barrel-Kortex dargestellt durch intrinsische optische Signale (IOS)
    - 3.3.1 Eigenschaften des IOS
    - 3.3.2 IOS nach Stimulation supragranulärer Laminae
    - 3.3.3 IOS nach Stimulation der granulären Lamina (L4)
    - 3.3.4 IOS nach Stimulation infragranulärer Laminae
    - 3.3.5 Neuropharmakologische Charakterisierung des IOS
  - 4. Diskussion
    - 4.1 Elektrophysiologische Eigenschaften der untersuchten Neurone
    - 4.2 Methodische Aspekte der angewandten Techniken
      - 4.2.1 Kartierung neuronaler Somata durch IR-gelenkte Photostimulation
      - 4.2.2 Das intrinsisch optische Signal (IOS)
    - 4.3 Funktionalität neuronaler Netzwerke
    - 4.4 Vertikale synaptische Verschaltungen innerhalb einer Kolumne
      - 4.4.1 Das rezeptive Feld (RF) der kortikalen Kolumne
      - 4.4.2 Die Barrels der Lamina 4 als unabhängige, kolumnäre Untereinheit
    - 4.5 L4 → L5 Projektionen - Kolumnäre Weiterleitung sensorischer Information?
    - 4.6 Horizontale Verschaltungen mehrerer Kolumnen
      - 4.6.1 Horizontale Weiterleitung der kolumnären Information durch supragranuläre Laminae
      - 4.6.2 Integration über mehrere Barrel-Kolumnen durch L5 Pyramidenneurone
      - 4.6.3 Periodische Organisation der L2/3 → L5 Projektionen
      - 4.6.4 Intralaminäre L5 Projektionen
      - 4.6.5 Rückkopplungsmechanismen der L5 Neurone
    - 4.7 Die Beteiligung von NMDA- und nicht-NMDA-Rezeptoren an den intrakortikalen Verschaltungen des Barrel-Kortex
    - 4.8 Inhibition im Barrel-Kortex
    - 4.9 Neuronale Plastizität synaptischer Verschaltungen im Barrel-Kortex
      - 4.9.1 Methode der sensorischen Deprivation
      - 4.9.2 Lokalisation neuronaler Plastizität
      - 4.9.3 Plastische Effekte sensorischer Deprivation
      - 4.9.4 Mechanismen neuronaler Plastizität im Barrel-Kortex
  - 5. Zusammenfassung
  - 6. Anhang
    - 6.1 Literatur
    - 6.2 Abkürzungen
    - 6.3 Verwendete Substanzen
    - 6.4 Curriculum vitae
    - 6.5 Eigene Arbeiten
    - 6.6 Danksagung



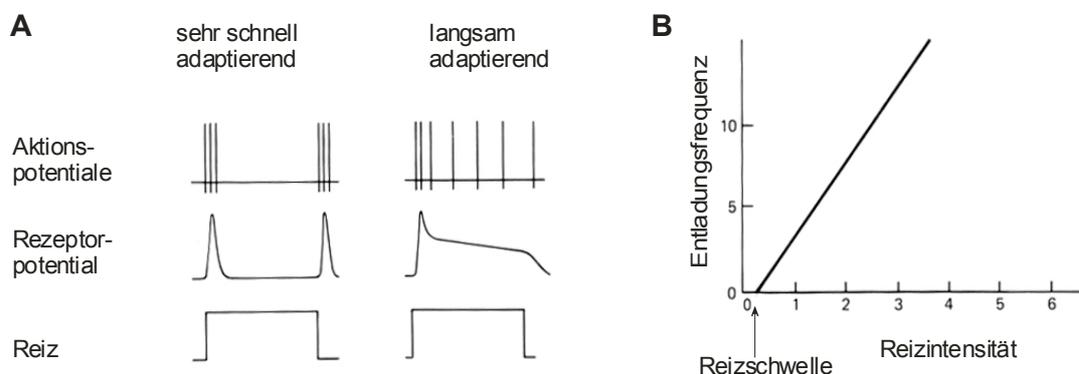
... das „beschnurrhaarte“ Untersuchungsobjekt ...

# 1. Einleitung

## 1.1 Das somatosensorische System

### 1.1.1 Der Tastsinn

Alle Informationen über Umwelt und Innenwelt erhält der Organismus über die Sinnesorgane. Im Laufe der Evolution haben sich die Sinnesorgane auf die Rezeption bestimmter Reize spezialisiert, für die sie hochsensitiv sind. Physiochemisch gesehen lassen sich 4 verschiedene Reizarten differenzieren: visuelle, chemische, thermische und mechanische Stimuli. Durch aktiv gesuchten (Ertasten) oder passiv erlittenen mechanischen Kontakt perzipieren beispielsweise die Mechanorezeptoren der Haut Druckveränderungen. Dadurch kann sich der Organismus gegen die Außenwelt abgrenzen sowie die Gestalt und die mechanischen Eigenschaften von Objekten (Oberflächenstruktur, Konsistenz) wahrnehmen. Der Tastsinn als Nahsinn führt eine lokale Frequenzanalyse durch, die sich auf tiefe Frequenzbereiche beschränkt ( $\leq 400$  Hz). Entsprechend ihres Adaptationsverhaltens lassen sich drei Typen von Mechanorezeptoren unterscheiden: langsam, schnell und sehr schnell adaptierende Rezeptoren (Abbildung 1.1A). Diese bilden den nullten, ersten und zweiten Differentialquotienten der Reize ab und kodieren somit die Eindruckstiefe (Druckrezeptor), Geschwindigkeit (Bewegungsrezeptor) und Beschleunigung (Vibrationsrezeptor) der mechanischen Deformation.

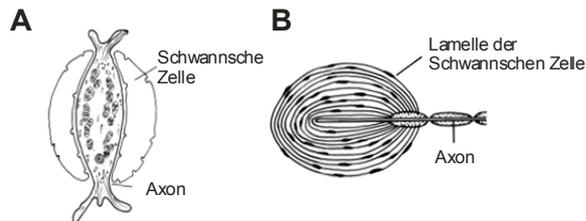


**Abbildung 1.1**

- A** Antwort sensorischer Rezeptoren mit unterschiedlichen Adaptationsgeschwindigkeiten auf einen Reiz
- B** Die Entladungsfrequenz eines sensorischen Neurons als lineare Funktion der Reizintensität (verändert nach Martin, 1991)

Die für die vorliegende Arbeit bedeutsamen Sinushaare (Vibrissen) der Ratten- und Mäuseschnauze gehören zu den langsam adaptierenden Mechanorezeptoren. Adaptation ist ein dynamisches Verhalten des taktilen Systems zur Wahrnehmung von Reizänderungen. Es erfolgt jedoch keine Empfindlichkeitsminderung zur Einstellung des Intensitätsbereiches wie im visuellen System. Infolge des geringen Dynamikbereiches ist eine lineare Umwandlung der mechanischen Reize in nervöse Erregung möglich (Abbildung 1.1B).

Im Gegensatz zu den optischen und akustischen Rezeptoren werden die taktilen Mechanorezeptoren von den peripheren Terminalen der Nervenfasern selbst gebildet, genauer von ihrem letzten marklosen Teil. Spezialisierte nervöse Rezeptorzellen sind nicht vorhanden. Komplexe Tastsinnesorgane enden in korpuskulären Strukturen, die der Reizumwandlung dienen. Innerhalb dieser Strukturen treten die sensorischen Nervenendigungen mit nicht-nervösen akzessorischen Zellen (meist Schwannschen Zellen) in Kontakt (Abbildung 1.2 A, B).



**Abbildung 1.2** Taktile Mechanorezeptoren

**A** Lanzettförmiger Rezeptor

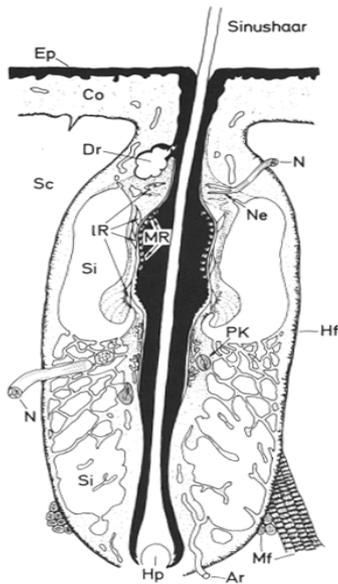
**B** Pacinisches Körperchen

(verändert nach Horn, 1982; Löwenstein und Mendelson, 1965)

### 1.1.2 Die Sinushaare (Vibrissen) der Schnauzenregion

Das Sinushaar der Vertebraten ist ein komplexes Sinnesorgan, das unter anderem in der Schnauzenregion der Ratten, in der Supraorbitalregion des Kaninchens oder als Schnurrhaar auf der Katzenoberlippe vorkommt. Besonders ausgeprägt ist es bei nachtaktiven und/oder in Gangsystemen lebenden Tieren, deren visuelles System nur spärlich entwickelt ist. Die Sinushaare dienen der Orientierung wie auch dem Erkunden der Umgebung. Als Nahsinnesorgane werden sie benutzt, um Objekte zu detektieren und deren Größe, Form und Oberfläche zu erfassen. Die somatosensorische Empfindlichkeit der Sinushaare übertrifft die vieler anderer behaarter als auch unbehaarter Hautoberflächen bei weitem. Ratten können mit ihrer Hilfe Oberflächenbeschaffenheiten unterscheiden, deren Rauigkeitsdifferenzen nur wenige Mikrometer betragen. Damit erreichen die Sinushaare dasselbe Empfindlichkeitsniveau wie die Fingerspitzen der Primaten (Carvell und Simons, 1990). Im natürlichen Verhalten wird diese Fähigkeit u.a. dazu benutzt, Körperverschmutzungen wahrzunehmen.

Sinushaare (Abbildung 1.3) sind steife, modifizierte Körperhaare, die über einen Follikel-Sinus-Komplex (FS-Komplex) in der Haut verankert sind. Der FS-Komplex besteht aus der epidermalen Follikel-Komponente, die von der dermalen Sinus-Komponente umgeben wird. Der Blutsinus, der das Haar und dessen Follikel frei schwingbar lagert, gliedert sich in einen distalen Ringsinus und einen proximalen kavernösen Sinus. Neben den sinusoidalen Strukturen zeichnen sich die Vibrissen durch eine komplexe Innervation aus. Als *Nervus infraorbitalis* innervieren myelinisierte und nicht-myelinisierte Fasern den FS-Komplex. Sie enden entweder als freie Nervenendigung oder als entsprechende Mechanorezeptoren (Merkel-Rezeptoren, lanzettförmige Rezeptoren, Pacinische Körperchen; Abbildung 1.2B).

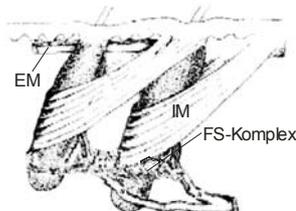


**Abbildung 1.3**

Aufbau des FS-Komplexes eine Sinushaars  
(verändert nach Horn, 1982)

Ar Arterie, Co Corium, Dr Talgdrüse, Ep Epidermis, Hf Haarfollikel, Hp Haarpapille, IR lanzettförmige Rezeptoren, Mf Muskelfilamente, MR Merkel-Rezeptor, N Nervus infraorbitalis, Ne freie Nervenendigung, PK Pacinisches Körperchen, Sc Subcutis, Si Sinus

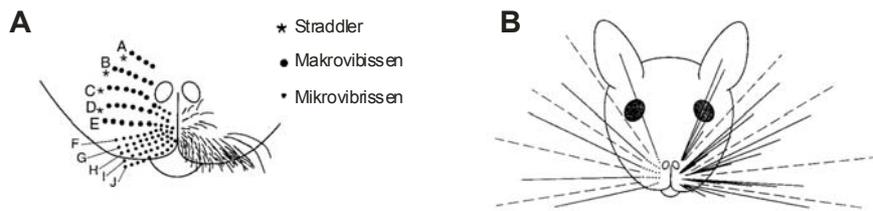
Verschiedenen Spezies der Ordnung Rodentia, darunter auch Ratte und Maus, können ihre Vibrissen aktiv bewegen. Dabei werden sie mit einer mittleren Frequenz von 8-10 Hz koordiniert vor- und zurückgeschlagen (Woolsey et al., 1975; Wineski, 1983; Fee et al., 1997; Sachdev et al., 2002). Sowohl die Frequenz als auch die Amplitude dieser Bewegungen können den Bedingungen entsprechend angepasst werden (Nicolelis et al., 1995; Simons und Carvell, 1996; O'Connor et al., 2002). Die Vorwärtsbewegung wird durch intrinsische Muskeln des Schnauzenbäckchens bewerkstelligt, die um die Basis eines jeden Vibrissenfollikels angeordnet sind. Die Rückwärtsbewegung dagegen erfolgt durch die passiven elastischen Eigenschaften von Bindegewebe und Blutsinus sowie durch die Kontraktion extrinsischer fazialer Muskulatur (Abbildung 1.4) (Dörfl, 1982; Carvell et al., 1991; Kleinfeld et al., 1999; O'Connor et al., 2002).



**Abbildung 1.4**

Extrinsische Muskulatur (EM) und intrinsische Muskulatur (IM) des FS-Komplexes zur Vorwärtsbewegung der Vibrissen. (verändert nach Berg und Kleinfeld, 2002)

Innerhalb des Schnauzenbäckchens kann zwischen den frontalen Mikrovibrissen und den lateralen Makrovibrissen unterschieden werden, deren Anordnung spezies- oder stammspezifisch ist (Abbildung 1.5). Die Makrovibrissen der Ratte bilden 5 parallele Reihen (von dorsal nach ventral mit A bis E bezeichnet) aus jeweils vier bis neun Einzelvibrissen bestehend (von kaudal nach rostral nummeriert). Versetzt zu diesen Reihen befinden sich am kaudalen Ende des Schnauzenbäckchens vier zusätzliche Vibrissen („straddler“). Innerhalb der Reihen werden die Makrovibrissen von posterior nach anterior kürzer (Orgelpfeifen-Architektur). Neueren Ansichten zufolge stellen sie eine Skala zur Distanzmessung dar. Die Makrovibrissen arbeiten dementsprechend als räumliche Distanzdetektoren und erfassen Objekte und deren Konturen durch Kodieren von Entfernungen (Brecht et al., 1997). Diese Auffassung unterscheidet sich von der traditionellen Sichtweise, welche die Vibrissen als ausgelagerte Hautoberfläche zur Wahrnehmung von Berührungen ansieht. Hierdurch entsteht ein pixelartiges Bild der Umgebung (Carvell und Simons, 1990). Diese Form der Objekterkennung wird nach Brecht lediglich von den Mikrovibrissen durchgeführt.

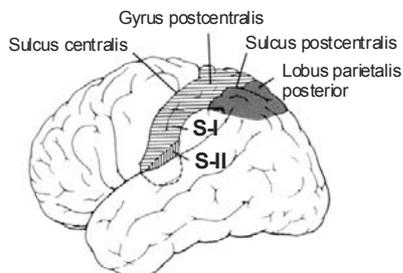


**Abbildung 1.5** Anordnung der Vibrissen bei der Ratte (frontale Aufsicht)  
**A** Nur die Mikrovibrissen sind vollständig dargestellt.  
**B** Nur die Makrovibrissen der linken Gesichtshälfte sind vollständig dargestellt.  
 (verändert nach Brecht, 1997)

### 1.1.3 Der somatosensorische Kortex

Der somatosensorische als auch der motorische und assoziative Kortex sind funktionelle Gebiete des Neokortex. Der somatosensorische Kortex spielt eine wichtige Rolle in der Verarbeitung somatosensorischer Modalitäten (Berührung, Temperatur, Schmerz). Er setzt sich im anterioren Teil des Lobus parietalis aus drei zytoarchitektonisch und funktionell unterscheidbaren Gebieten zusammen (Abbildung 1.6).

Der primäre somatosensorische Kortex (SI) als direkter Empfänger der sensorischen Information aus dem Thalamus liegt im *Gyrus postcentralis* sowie am Grunde des *Sulcus centralis*. Posteriolateral dazu befindet sich der sekundäre somatosensorische Kortex (SII) im Bereich des *Sulcus lateralis* lokalisiert. Neben diesen beiden Regionen erhält der posteriore Teil des *Lobus parietalis* ebenso somatosensorische Eingänge. Hierbei handelt es sich um ein Kortexareal höherer Ordnung, welches sensorische und motorische Informationen miteinander verbindet.



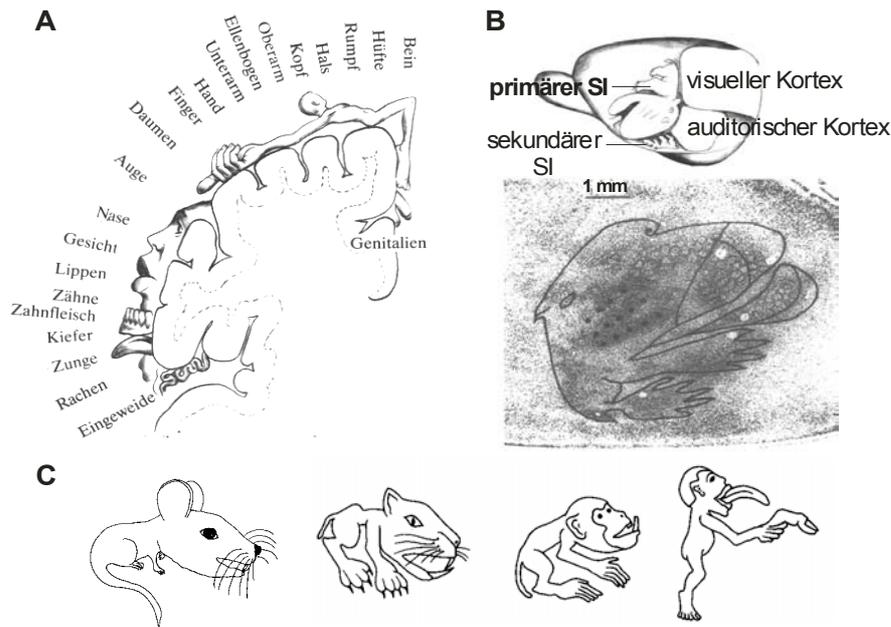
**Abbildung 1.6**  
 Anatomische Lage des SI und SII  
 (verändert nach Martin und Jessell, 1991)

Gemäß traditionellen Ansichten sind diese drei somatosensorischen Teilgebiete seriell miteinander verschaltet. Die sensorischen Informationen werden im SI analysiert, nachfolgend mit anderen Eingängen im SII integriert und abschließend in höheren Kortexareale assoziativ verarbeitet. Neuere Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass die somatosensorische Information auf den verschiedenen kortikalen Ebenen auch parallel verarbeitet wird.

### 1.1.3.1 Organisationsprinzipien des SI

#### **Somatotope Organisation**

Der primäre somatosensorische Kortex repräsentiert die gesamte Körperoberfläche topographisch in Form eines Homunkulus bzw. Rattunkulus (Abbildung 1.7A, B). Das Gesicht, besonders die Mundregion ist im SI der Nager und Karnivoren überproportional stark vertreten. Dies spiegelt offenbar die stark explorative Funktion des Mundes bei diesen Tieren wider (Abbildung 1.7C).



**Abbildung 1.7** Somatotope Repräsentation im Kortex

**A** Homunkulus

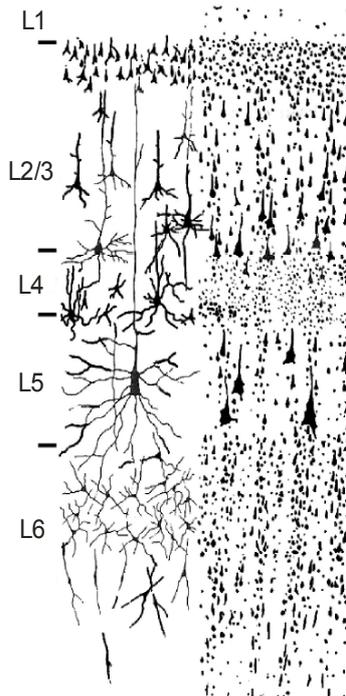
**B** Rattunkulus

**C** Die Körperregionen sind entsprechend ihrer Wichtigkeit im Kortex unterschiedlich stark repräsentiert.

(verändert nach Kandel und Jessell, 1991; Welker, 1976)

### Laminäre Organisation

In Analogie zum *Bulbus olfactorius*, dem Hippokampus und dem Cerebellum zeichnet sich der gesamte Neokortex und somit auch der somatosensorische Kortex durch einen geschichteten Aufbau aus. Für diese Schichtung sind Unterschiede in der Zusammensetzung und Dichte der Zellen, der Form und Größe ihrer Somata sowie der Faserprojektionen verantwortlich (zur Übersicht siehe Sheperd, 1990). Nach Brodman (1909) wird der Neokortex in sechs Laminae (L 1-6) eingeteilt, die zwischen der Pia mater und der weißen Substanz liegen (Abbildung 1.8).



**Abbildung 1.8**

Schichtung des Neokortex (verändert nach Creutzfeld, 1983)  
links: Golgi-Imprägnation, rechts: Nisslfärbung

Lamina 1: Die äußere plexiforme Schicht enthält nur wenige Somata und besteht vorwiegend aus den Ausläufern apikaler Dendriten sowie aus horizontal verlaufenden Axonen.

In Lamina 2/3 sind vorwiegend Pyramidenneurone kleiner und mittlerer Größe sowie Interneurone (z.B. Sternzellen) lokalisiert.

Lamina 4 wird als granuläre oder Körnerschicht bezeichnet und enthält hauptsächlich Sternzellen. Diese Schicht ist besonders in den sensorischen Arealen ausgeprägt und fehlt in den motorischen Gebieten.

In Lamina 5, der ganglionären Schicht, sind große Pyramidenneurone und Interneurone lokalisiert.

Lamina 6 wird von Spindelzellen und wenigen mittelgroßen Pyramidenneuronen gebildet

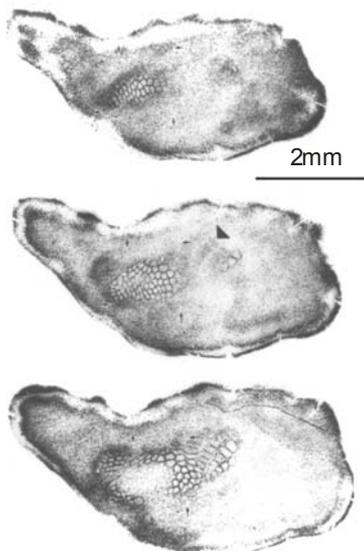
### Kolumnäre Organisation

Der somatotopen und laminären Organisation überlagert sich eine vertikale Differenzierung, die den Kortex in säulenförmige Unterareale (Kolumnen) gliedert. Histologische Belege für die anatomisch kolumnäre Organisation des Kortex existiert schon seit langem (Lorente De Nó, 1938). Mountcastle postulierte 1957 die Kolumne als funktionelle Grundeinheit, aus der sich der gesamte Kortex zusammensetzt. Mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden (Mountcastle, 1978) konnte er nachweisen, dass jeder Kolumne des SI einheitliche Reizsubmodalitäten (z.B. Adaptionsverhalten) zugeordnet werden können. Außerdem stellt jede Kolumne eine basale Verarbeitungseinheit kortikaler synaptischer Schaltkreise dar (Douglas und Martin, 1991).

### 1.1.3.2 Der Fässchenkortex (Barrel-Kortex) der *Rodentia*

Schon in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden zytoarchitektonische Besonderheiten im zerebralen Kortex von Maus, Ratte und Meerschweinchen beobachtet. Das Interesse an diesen Besonderheiten wurde entfacht als Woolsey 1967 nachwies, dass es sich hierbei um ein ausgedehntes Netzwerk handelt, das innerhalb des primären somatosensorischen Kortex liegt. Genauer beschrieben wurde dieses Netzwerk durch Woolsey und van der Loos (1970) anhand Nissl gefärbter tangentialer Schnittserien (Abbildung 1.9). Sie beobachteten, dass Lamina 4 eine Schicht zylindrisch geformter multineuronaler Einheiten enthält, die sie entsprechend ihrer Form als Fässchen oder „Barrels“ bezeichneten. Da die Anordnung der Barrels derjenigen der Sinushaare (Vibrissen) des Schnauzenbäckchens ähnelt, stellten sie die Hypothese auf, dass die Barrels kortikale Korrelate der Vibrissen darstellen, wobei ein Barrel eine Vibrisse im 1:1-Verhältnis somatotop repräsentiert.

Des Weiteren vermuteten sie, dass die Barrels in Lamina 4 das morphologische Korrelat der funktionalen kortikalen Kolumne sind. Eine solche wurde schon im somatosensorischen Kortex von Katze und Affe beschrieben (Mountcastle, 1957; Powell und Mountcastle, 1959). Mehrere Forschungsgruppen haben seither nachgewiesen, dass jedes Barrel einer bestimmten homologen, kontralateralen Vibrisse zugeordnet ist. Welker führte 1971 erste Kartierungsexperimente mittels Mikroelektroden durch, wobei einzelne kontralaterale Vibrissen stimuliert wurden. Dadurch konnte er zeigen, dass der Barrel-Kortex tief narkotisierter Ratten einen somatotopisch organisierten Bereich sich nicht überschneidender rezeptiver Felder darstellt und damit eine topographische Repräsentation der Vibrissen des Schnauzenbäckchens liefert. Neuere Studien mit wachen bzw. leicht anästhesierten Tieren haben bestätigt, dass jedes Barrel bevorzugt auf die Stimulation der homologen, kontralateralen Vibrisse reagiert. Werden unmittelbar benachbarte Vibrissen stimuliert, können jedoch Antworten mit höherer Reizschwelle ausgelöst werden (Simons, 1978, 1983, 1985; Simons und Woolsey, 1979; Chapin und Lin, 1984; Ito, 1985; Chapin, 1986; Armstrong-James und Fox, 1987; Simons und Carvell, 1989; Kossut, 1992; Simons et al., 1992).



**Abbildung 1.9**

Nissl gefärbte Tangentialschnitte des SI der Maus  
Der Pfeil weist auf eine Barrelreihe des PMBFS  
(„posteromedial barrel subfield“) hin.  
(verändert nach Woolsey und Van der Loos, 1970)

Obgleich weiterhin kontroverse Meinungen über Definition und Basis der funktionellen, kortikalen Kolumne bestehen (Favorov et al., 1987; Favorov und Diamond et al., 1990; Yuste et al., 1992; White und Peters, 1993), haben mehrere elektrophysiologische und morphologische Studien bestätigt, dass Neurone der supra- und infragranulären Laminae mit dementsprechenden Barrel in Lamina 4 sowohl eine strukturelle als auch eine funktionelle Einheit bilden, die so genannte Barrel-Kolumne (Simons, 1978; Simons und Woolsey, 1979; Chapin, 1986; Escobar et al., 1986; Armstrong-James und Fox, 1987;

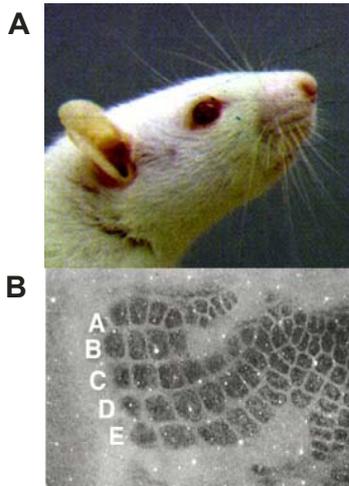
Chmielowska et al., 1989; Killackey et al., 1989; Bernardo et al., 1990a, b; Armstrong-James et al., 1992; Ito, 1992; Simons et al., 1992; White und Peters, 1993). Dementsprechend führten Nachweise des mitochondrialen Enzyms Zytochromoxidase nicht nur zu Markierungen innerhalb der Barrels, sondern zeigten Zonen intensiver Stoffwechselaktivität innerhalb der gesamten Kolumnen auf, inklusive der infra- und supragranulären Schichten (Land und Simons, 1985 a, b). Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien mit 2-Deoxyglucose, einem Marker für Stimulus-evozierte Stoffwechselaktivität. Die Stimulation einer Vibrisse führte zur Markierung einer einzelnen Kolumne, die sich von Lamina 1 bis 6 des Barrel-Kortex erstreckt (Chmielowska et al., 1986 a; Kossut et al., 1988). Weiterhin belegen auch elektrophysiologische Daten, dass die Neurone über, unter und innerhalb eines Barrels alle vorzugsweise von derselben, topografisch entsprechenden Vibrisse aktiviert werden. Waren die untersuchten Tiere jedoch nur schwach narkotisiert, antworteten die Neurone einer Kolumne nicht nur auf die Stimulation einer, sondern mehrerer benachbarter Vibrissen (Bernardo et al., 1990a, b; Ito, 1992; Simons et al. 1992).

Aufgrund der morphologischen und funktionellen Korrelation von Barrels und Vibrissen sowie von Barrels und Kolumnen ist dieses somatosensorische System ein wichtiges Modell zur Untersuchung von Struktur, Funktion, Entwicklung und Plastizität des primären sensorischen Kortex.

#### **1.1.3.2.1 Strukturelle Eigenschaften des Barrel-Kortex**

Vergleichende Studien haben gezeigt, dass bei allen bis jetzt untersuchten Säugetieren Lamina 4 des primären somatosensorischen Kortex (SI) relativ zu supra- und infragranulären Schichten eine erhöhte Zelldichte aufweist. Zytoarchitektonisch abgrenzbare Barrels kommen jedoch nur bei einigen wenigen Arten vor, die stark ausgeprägte Vibrissen besitzen. Vertreter dieser Arten gehören zu den Ordnungen der Marsupialia (Beuteltiere), der Lagomorpha (Hasenartige) oder der Rodentia (Nagetiere).

Barrels wurden in der Region des parietalen Kortex nachgewiesen, der physiologisch dem primären somatosensorischen Kortex (SI) entspricht (Welker, 1971; Simons und Woolsey, 1979). In jeder Hemisphäre können zwischen 170 und 210 (Maus) bzw. zwischen 165 und 225 (Ratte) Barrels vorkommen und ein Areal von bis zu 2,8 mm<sup>2</sup> (Maus) bzw. 6,4 mm<sup>2</sup> (Ratte) einnehmen. Anatomisch wird der Barrel-Kortex in zwei Gebiete unterteilt. Der anterolaterale Teil enthält dicht gepackte, kleine Barrels mit rundem Querschnitt, die den Vibrissen der vorderen Schnauze entsprechen. Der posteromediale Teil, welcher als posteromediales Subareal des Barrel-Kortex („posteromedial barrel subfield“, PMBSF) bezeichnet wird, weist eine konstante Anzahl Barrels mit charakteristischer Organisation auf (Abbildung 1.10). Die Barrels des PMBSF sind in fünf Reihen angeordnet, welche von anterolateral nach posteromedial orientiert sind. Sie entsprechen den fünf Reihen der großen Vibrissen des kaudalen Teils des Schnauzenbäckchens (Woolsey und Van der Loos, 1970) und werden dementsprechend bezeichnet (siehe Kapitel 1.1.2). Im Vergleich zu den Barrels des anterolateralen Feldes sind die Barrels des PMBSF mit einem Durchmesser von bis zu 280 µm (Maus) bzw. 400 µm (Ratte) etwa doppelt so groß und eher oval als zylindrisch geformt.

**Abbildung 1.10**

**A** Schnauzenbäckchen einer Ratte mit Vibrissen  
**B** Tangentialschnitt des Barrel-Kortex der Ratte (Cytochromoxidasefärbung). Die fünf Barrel-Reihen, die den fünf Vibrissen-Reihen entsprechen, sind mit A bis E bezeichnet.  
 (verändert nach Simons, 2002)

In Lamina 4 des granulären SI verschiedener Spezies kann zwischen einer hohlen („hollow“) und einer massiven („solid“) Barrel-Form unterschieden werden. Die Hohlform weist zylindrisch bzw. oval geformte, zell-dichte Seitenwände auf, die eine zentrale, zellärmere Aushöhlung ringförmig umgeben. Einzelne Barrels werden durch dünne, nahezu zellfreie Septen voneinander getrennt (Kossut et al., 1991). In einer vergleichenden Studie (Welker und Woolsey, 1974) zeigte sich, dass das anterolaterale Barrel-Feld von Maus und Ratte wie auch das PMBSF der Maus durch die hohle Barrelform charakterisiert wird. Das PMBSF der Ratte hingegen weist die massive Form der Barrels auf, die hierbei als kompakte Zellhaufen ohne Aushöhlung auftreten und ebenfalls durch Septen voneinander abgegrenzt werden.

Die charakteristische Struktur des Barrel-Kortex resultiert jedoch nicht nur aus der unterschiedlichen Dichte der neuronalen Somata, sondern auch der anderer zellulärer Elemente in den Wänden, Höhlen und Septen der Barrels. Die Somata der Gliazellen sind zum Beispiel hauptsächlich in den Wänden und unteren Enden der Barrels zu finden (Patel-Vaidya, 1985). Myelinisierte wie auch nicht myelinisierte Axone laufen bevorzugt in den Barrelwänden und -septen (White, 1976). Blutgefäße bilden in erster Linie innerhalb der Barrelhöhlen Kapillarnetze aus (Patel, 1983).

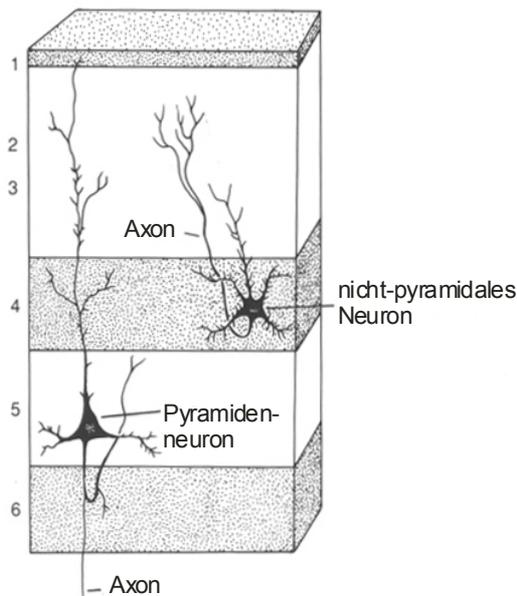
Durch diese zytoarchitektonischen Besonderheiten sind die Barrels auch im nativen, ungefärbten Hirnschnitt leicht zu erkennen. Histochemische und immunzytochemische Methoden zeigen eine Korrelation zwischen den Barrels und erhöhten Konzentrationen von Stoffwechsellenzymen wie Cytochromoxidase (beschränkt auf die zentralen Bereiche der Barrels), Succinyldehydrogenase, Hexokinase und Glykogenphosphorylase auf (Land und Simons, 1985a, b; Wallace, 1987; Dietrich et al., 1982; Riddle et al., 1992; Jacquin et al., 1993). Mit Hilfe dieser Färbetechniken lassen sich Barrel-ähnliche Muster auch im somatosensorischen Kortex solcher Spezies nachweisen, deren Hirnschnitte im nativen Zustand keinerlei Hinweise auf derartige Strukturen liefern. Abgesehen von den charakteristischen Barrels in Lamina 4 unterscheidet sich die Zytoarchitektur des Barrel-Kortex nicht von der anderer sensorischer Gebiete des zerebralen Kortex.

### 1.1.3.2.2 Neuronale Zellklassen des Barrel-Kortex

Der Barrel-Kortex ist in seiner zellulären Ausstattung anderen sensorischen Kortextarealen sehr ähnlich. Bezüglich der Morphologie können zwei Hauptklassen von Neuronen unterschieden werden, die Pyramidenzellen sowie die nicht-pyramidalen Zellen.

#### **Pyramidenzellen**

Entsprechend ihrer Namensgebung haben Pyramidenzellen ein pyramidenförmiges Soma, von dessen Apex der dominante apikale Dendrit entspringt (Abbildung 1.11). Zusätzlich weisen sie ein Geflecht reich verzweigter, basaler Dendriten auf, die ebenso wie der apikale Dendrit mit Dornfortsätzen ausgestattet sind. Es handelt sich um exzitatorische Neurone, die hauptsächlich die Neurotransmitter Glutamat und Aspartat ausschütten (Dori et al., 1992). Das Axon der Pyramidenzellen projiziert zu kortikalen und subkortikalen Gebieten, die mehrere Millimeter entfernt sein können (Projektionsneurone). Es trägt jedoch ebenso zu lokalen Verschaltungen im Kortex bei.



**Abbildung 1.11** Ausschnitt aus dem Neokortex Exemplarisch dargestellt ist ein Lamina 5 Pyramidenneuron und eine nicht-pyramidale Zelle der Lamina 4 mit entsprechender Axon- und Dendritenmorphologie. (verändert nach Kelly und Dodd, 1991)

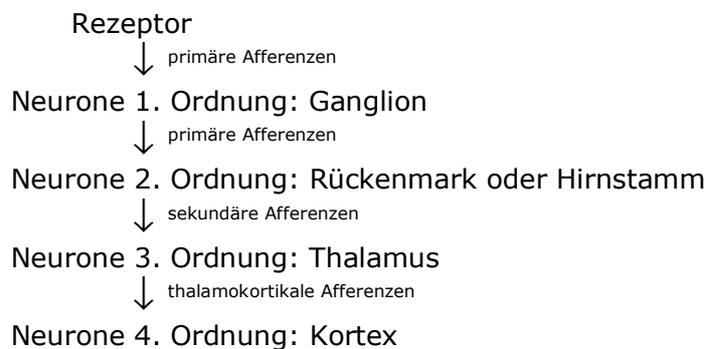
Pyramidenzellen sind in den Laminae 2 bis 6 zu finden, wobei sie in Lamina 4 jedoch seltener vorkommen. Entsprechend ihrer Lokalisation projizieren sie zu verschiedenen Zielgebieten (siehe Kapitel 1.1.3.2.4). Pyramidenzellen können entsprechend ihrer intrinsischen Membraneigenschaften klassifiziert werden (McCormick et al., 1985; Connors und Gutnick, 1990). RS-Zellen („regular-spiking cells“) antworten auf intrazelluläre Strominjektion mit relativ breiten Aktionspotentialen (langsame Repolarisationsrate) und einer deutlichen Adaptation der Aktionspotential-Frequenz. IB-Zellen („intrinsically bursting cells“) dagegen antworten mit gruppierten Aktionspotentialen hoher Frequenz. Die Lokalisation ihrer etwas größeren Somata beschränkt sich auf Lamina 4 und 5, hingegen ist die Verzweigung der apikalen und basalen Dendriten stärker ausgeprägt (Agmon und Connors, 1989; Chagnac-Amitai et al., 1990). Die Axonkollateralen der IB-Zellen verlaufen gewöhnlich in den infragranulären Laminae, um horizontal zu weit entfernten Zielarealen zu projizieren. Die RS-Zellen verfügen hingegen über aufsteigende Axonkollateralen, die sich in den supragranulären Laminae verzweigen (Chagnac-Amitai et al., 1990).

### **Nicht-pyramidale Zellen**

Nicht-pyramidale Zellen sind lokal projizierende Interneurone mit ovalen Somata (Abbildung 1.11). Sie stellen eine morphologisch heterogene Neuronenklasse dar, die nach dem Vorhandensein dendritischer Dornfortsätze („spines“) in zwei Subklassen unterteilt werden kann (Simons und Woolsey, 1984; Sheperd, 1990). Neurone mit dendritischen Dornfortsätzen („spiny cells“) sind vermutlich exzitatorisch (White, 1989). Wichtige Vertreter dieser Subklasse sind die „spiny stellate cells“, welche sensorische Informationen direkt vom Thalamus erhalten. Neurone ohne dendritische Dornfortsätze („smooth“ oder „non-spiny“) sind hingegen meist inhibitorische GABAerge Zellen (McCormick et al., 1985, Jonas und Spruston, 1994). Aufgrund der intrinsischen Membraneigenschaften der GABAergen Interneurone spricht man auch von FS-Zellen („fast-spiking cells“). Charakteristisch für diese Neurone sind kurze Aktionspotentiale (schnelle Repolarisationsrate), eine hohe Aktionspotential-Frequenz ohne Adaptation sowie eine hohen Spontanaktivität (McCormick et al., 1985; Connors und Gutnick, 1990).

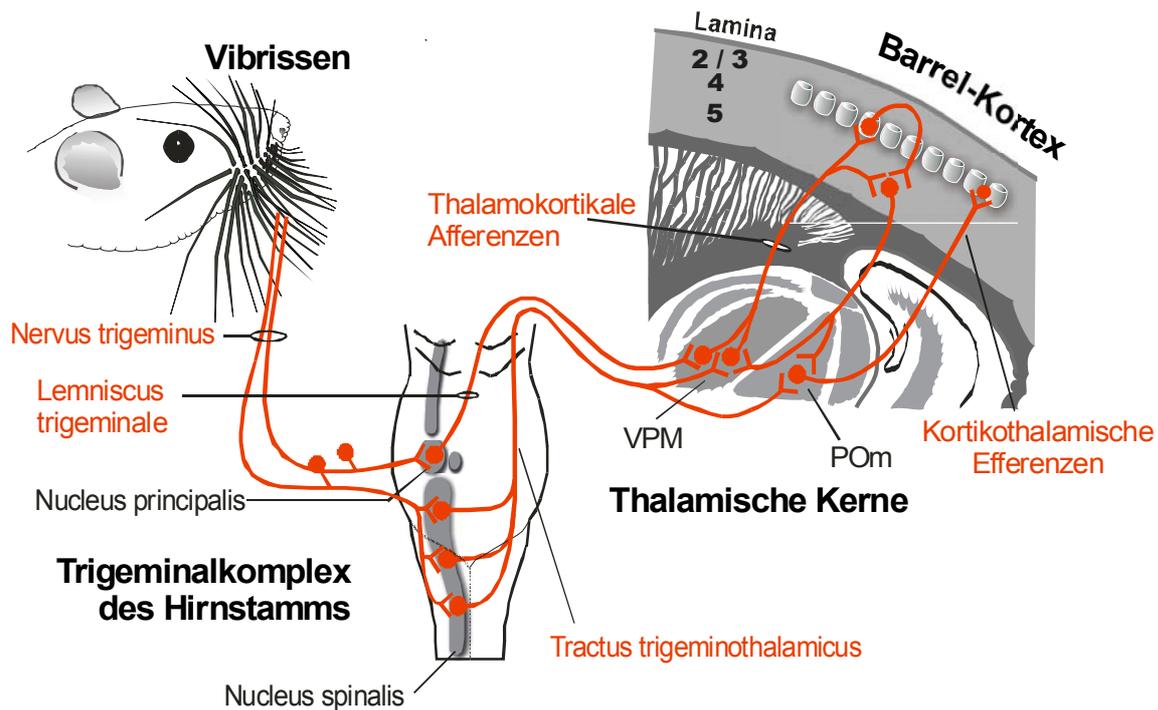
#### **1.1.3.2.3 Der Signalübertragungsweg von der Vibrisse zum Barrel-Kortex**

Der Übertragungsweg somatosensorischer Information von der Vibrisse zum Barrel-Kortex ist prinzipiell wie der aller sensorischen Modalitäten strukturiert:



Jede Vibrisse wird von 70-170 myelinisierten und 20-60 unmyelinisierten Axonen innerviert, die sich zu Nervenbündeln formieren und sich kaudal des Schnauzenbäckchens zum *Nervus infraorbitalis*, einem sensorischen Teil des *Nervus trigeminus* (V. Hirnnerv), vereinigen. Die pseudounipolaren Somata dieser primären Afferenzen liegen im *Ganglion trigeminale Gasseri* (Ganglion V) (Dörfl, 1985) und ihre Axone enden im Trigeminalkomplex des Hirnstamms (*Nucleus principalis PrV*, *Nucleus spinalis interpolaris SpVi*, *caudalis SpVc* und *oralis SpVo*) (Hyashi, 1980) (Abbildung 1.12). Die meisten Afferenzen dieses Kernkomplexes kreuzen als *Lemniscus trigeminalis* auf die kontralaterale Seite. Über diesen Trakt wird die somatosensorische Information an zwei Kerngebiete des Thalamus weitergeleitet: a) an den *Nucleus ventralis posterior* des lateralen Thalamus (*Ventrobasalkomplex VP*), genauer an dessen medialen Anteil (*Nucleus ventralis posterior thalami pars medialis VPM*) (Smith, 1980) und b) an den *Nucleus posterior thalami pars medialis* (POm).

Beide thalamischen Kerne projizieren zu unterschiedlichen Regionen des Barrel-Kortex. Die Faserterminalen des VPM konzentrieren sich in den zentralen Bereichen der Barrel-Kolumne, d.h. vor allem in den Barrels der Lamina 4 und der Grenze zwischen Lamina 5 und 6. Wandbereiche der Kolumnen werden nicht von ihnen innerviert (Bernardo und Woolsey, 1987; Jensen und Killackey, 1987; Lu und Lin, 1993). Die Faserterminalen der POm sind hingegen komplementär dazu verteilt (Abbildung 1.14). Ihre Afferenzen sind, über alle Laminae hinweg, in den Bereichen zwischen den Barrel-Kolumnen sowie direkt über und unter den Barrels nachweisbar (Chmielowska, 1989; Lu und Lin, 1993).

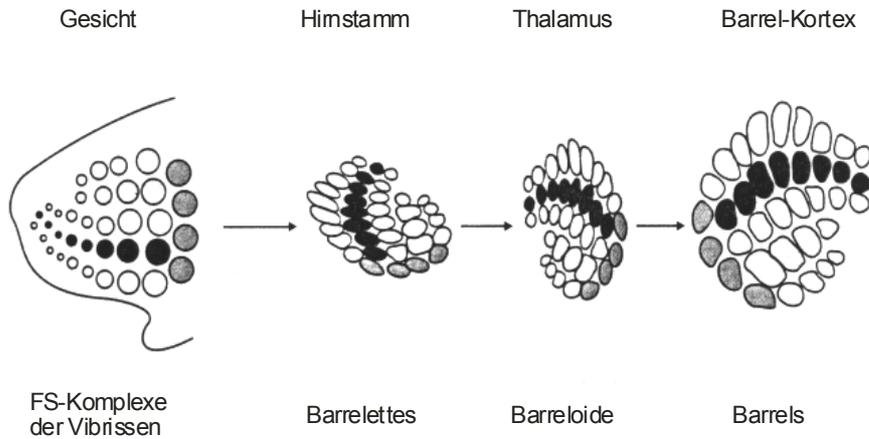


### Abbildung 1.12

Der somatosensorische Signalübertragungsweg von der Vibrisse zum Barrel-Kortex. VPM Nucleus ventralis posterior thalami pars medialis, POm Nucleus posterior thalami pars medialis

### Somatotopie des sensorischen Signalübertragungsweges

Der Barrel-Kortex ist nicht die einzige Struktur, die eine somatotopische Organisation aufweist (O'Leary et al., 1994; Killackey et al., 1995). Auf dem gesamten Signalübertragungsweg von der Peripherie bis zum ZNS (Zentralnervensystem) ist die Somatotopie unterschiedlich stark ausgeprägt. Die zentralen Projektionen des *Ganglion trigeminale* sind in wenigstens drei (PrV, SpVi, SpVc) der vier trigeminalen Hirnstammkerne innerhalb longitudinaler Kolumnen somatotop separiert. Jede Vibrisse wird in Form eines Zellclusters, das als „Barrelette“ bezeichnet wird, topographisch repräsentiert (Abbildung 1.13).

**Abbildung 1.13**

Somatotopie des Signalübertragungsweges von der Vibrisse zum Barrel

Die FS-Komplexe der Vibrissen werden auf allen dargestellten Ebenen (Hirnstamm, VPM des Thalamus, Barrel-Kortex) 1:1 repräsentiert.

(verändert nach O'Leary et al., 1994)

Der POM weist zwar eine somatotopie Organisation auf, aber keine Repräsentation einzelner Vibrissen, da die trigeminalen Afferenzen hier divergieren. Seine großen rezeptiven Felder (RF) umfassen mehrere Vibrissen, deren Eingänge integriert werden (Fabri und Burton, 1991; Diamond et al., 1992a).

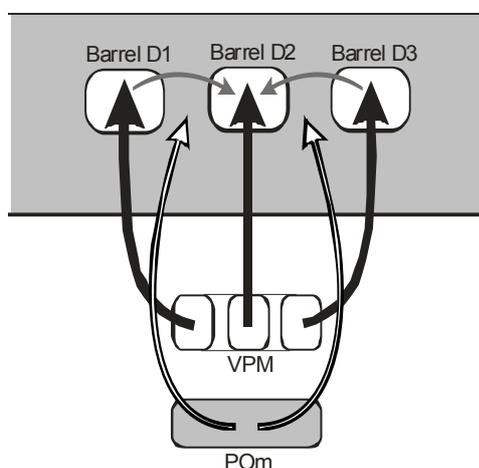
Der VPM dagegen kann in eigenständige funktionelle Einheiten (Barreloide) unterteilt werden (Abbildung 1.13). Diese dicht gepackten Zellcluster können topographisch jeweils einer Vibrisse zugeordnet werden (van der Loos, 1976; Land und Simons, 1985c; Ito, 1988; Sugitani, 1990). Die Axonkollaterale der trigeminalen Afferenzen zum VPM füllen das jeweilige Barreloid aus, überschreiten dessen Grenzen aber nicht (Williams et al., 1994). Trotz dieses 1:1-Verhältnisses Vibrisse/Barreloid besteht das RF aus mehreren Vibrissen, wobei die zentrale Vibrisse stets die stärkste Antwort evoziert (Simons und Carvell, 1989; Armstrong-James und Callahan, 1991; Diamond et al., 1992a). Vom VPM wird über die thalamokortikalen Afferenzen die Somatotopie an den Barrel-Kortex weitergeleitet. Einem Barrel entspricht sowohl ein topographisches VPM Barreloid als auch eine Vibrisse (Lu und Lin, 1993).

### 1.1.3.2.4 Synaptische Organisation des Barrel-Kortex

#### **Kortikale Antworten auf Stimulation der Vibrissen**

Die Neurone eines Barrels bzw. einer Barrel-Kolumne reagieren bevorzugt auf die Stimulation der entsprechenden somatotop repräsentierten Vibrisse (Armstrong-James, 1975; Simons, 1978; Ito, 1985) und besitzen somit ein gemeinsames RF aus einer einzelnen Vibrisse. Begründet wird dies durch die topographische Organisation der thalamokortikalen Terminalen des VPM. Afferenzen der Barreloide enden fast ausschließlich innerhalb der topographisch entsprechenden Barrel-Kolumnen (Bernardo und Woolsey, 1987; Jensen und Killackey, 1987).

Die Neurone eines Barrels antworten jedoch nicht ausschließlich auf die Stimulation einer einzelnen, ihnen zugeordneten (somatotopen) Vibrisse. Ihr RF besteht aus zwei unterschiedlichen Komponenten, der o.g. einzelnen, zentralen Vibrisse (singleRF) und den benachbarten, peripheren Vibrissen (multiRF). Wird als zentrale Vibrisse zum Beispiel D2 stimuliert (zentrale Stimulation), antworten die Neurone des entsprechenden D2 Barrels mit einer Stärke von einem Aktionspotential pro Stimulus und einer Latenzzeit von 7-10 ms (Armstrong-James und Fox, 1987; Diamond et al., 1993). Diese Aktionspotentiale werden sowohl durch direkte Eingänge des entsprechenden VPM Barreloids D2 als auch durch lokale vertikale Verschaltungen innerhalb der D2 Barrel-Kolumne erzeugt (Armstrong-James et al., 1992, 1993). Werden hingegen periphere, benachbarte Vibrissen stimuliert (periphere Stimulation), ist die Antwort der D2 Barrelneurone auf 40% (0,4 Aktionspotentiale/Stimulus) verglichen zur zentralen Stimulation reduziert. Die Latenzzeit steigt dabei auf ca. 20 ms an (Armstrong-James und Fox, 1987; Diamond et al., 1993). Die Information des multiRF des VPM Barreloids D2 wird auf das kortikale Barrel D2 übertragen, um so zum multiRF dieses Barrels beizutragen. Den weit entscheidenderen Beitrag zum multiRF der Barrels leistet jedoch die horizontale intrakortikale Verschaltung benachbarter Barrels. Einen wichtigen Hinweis dafür lieferten Läsionsstudien. Wird innerhalb eines zu D2 benachbarten Barrels eine Läsion erzeugt, hatte dies zur Folge, dass die Vibrisse dieses Barrels aus dem RF des D2 Barrels verschwand und deren Stimulation keine kortikale Antwort mehr evozierte (Armstrong-James et al., 1991a). Die Kommunikation zwischen den Barrel-Kolumnen wird über ein lokales Netzwerk vermittelt, welches hauptsächlich die Laminae direkt über und unter den Barrels wie auch die Septen zwischen den benachbarten Barrels involviert (Chapin et al., 1987; Bernardo et al., 1990a, b; Nicoletis et al., 1991; Kim und Ebner, 1999). Der POm, dessen Afferenzen in diesen Bereichen Synapsen bilden, könnte die kortikale Informationsübertragung zwischen den Barrels modulieren (Abbildung 1.14).



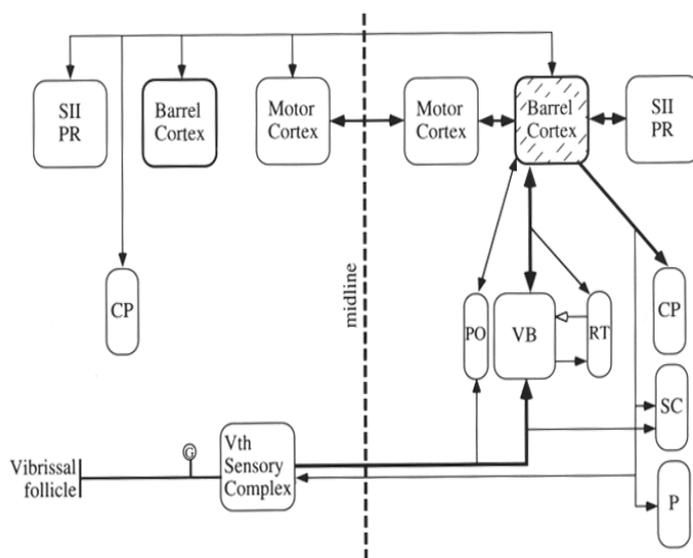
**Abbildung 1.14** Die Rolle des VPM und des POm bei der Kommunikation verschiedener Barrels.

VPM Neurone projizieren direkt auf die Lamina 4 Barrels. Der POm projiziert in die Bereiche zwischen den Barrels. Die Informationsübertragung zwischen den Barrels erfolgt über Verschaltungen, die durch den POm moduliert werden könnten.

VPM Nucleus ventralis posterior thalami pars medialis, POm Nucleus posterior thalami pars medialis

### Kortikokortikale Verbindungen des Barrel-Kortex

Der Barrel-Kortex der Rodentia ist, ähnlich dem primären somatosensorischen Kortex anderer Spezies, reziprok mit einer Reihe ipsi- und kontralateral gelegenen Kortexregionen verbunden (Abbildung 1.14). Projektionen zum sekundären somatosensorischen Kortex (SII) und zum motorischen Kortex sowie auch deren Rückprojektionen zum Barrel-Kortex scheinen topographisch organisiert zu sein (Carvell und Simons, 1987; Fabri und Burton, 1991). Kortikokortikale Verbindungen vom und zum Barrel-Kortex werden von Pyramidenneuronen der Lamina 2/3 und 5 gebildet (Elhanany und White, 1990), die die exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat und Aspartat ausschütten (Giuffrida und Rustioni, 1989).



**Abbildung 1.14**

Darstellung der afferenten und efferenten Übertragungswege des Barrel-Kortex.

Die Pfeildicke kodiert die Stärke der synaptischen Verbindung CP Nucleus caudatus putamen, G Ganglion trigeminale, P Pons, PO Nucleus posterior thalami, PR perirhinaler Kortex, RT Nucleus reticularis thalami, SC Nucleus colliculus superior, SII sekundärer somatosensorischer Kortex, VB Nucleus ventralis posterior (verändert nach Keller, 1995)

### Intrinsische Verschaltungen des Barrel-Kortex

70% der Synapsen des Barrel-Kortex sind intrinsischen Ursprungs (Gruner et al., 1974). Diese intrinsischen Verbindungen beeinflussen maßgeblich die Antworteigenschaften kortikaler Neurone (Gilbert, 1992; Keller, 1993). Die überwiegende Anzahl intrakortikaler Axone des Barrel-Kortex projiziert vertikal innerhalb einer Barrel-Kolumne. Interlaminäre Schaltkreise verbinden sowohl infra- und supragranuläre Laminae als auch Lamina 4 einer funktionellen Kolumne reziprok miteinander (Fonseca et al., 1988; Bernardo et al., 1990b; Armstrong-James et al., 1992). Neben diesen kolumnären Projektionen verlaufen horizontale Axonkollaterale zwischen benachbarten Barrel-Kolumnen. Diese Axonkollaterale laufen bevorzugt innerhalb derselben Barrelreihe (Bernardo et al., 1990b; Fabri und Burton, 1991; McCashland et al., 1992). Projektionen zwischen zwei verschiedenen Barrelreihen sind seltener und weisen bevorzugte in Richtung der anterior gelegenen Reihe (Hoogland et al., 1987; Bernardo et al., 1990a). In funktionellen Studien zeichnen sich anteriore im Vergleich zu posterioren Kolumnen durch eine höhere Stoffwechselaktivität aus (McCashland und Woolsey, 1988), d.h. interkolumnäre Projektionen zwischen den Barrelreihen sind zu den metabolisch aktiveren Barrels gerichtet, was sich auch anatomisch belegen lässt (Bernardo et al., 1990a, b).

### **Projektionen zu subkortikalen Bereichen**

Die wichtigsten kortikofugalen Projektionen des Barrel-Kortex sind in Abbildung 1.14 zusammengefasst. In einigen ihrer Zielgebiete bleibt die Somatotopie durch die efferenten Bahnen der einzelnen Kolumnen erhalten. Efferenzen zum Trigeminalskomplex enden im selben Bereich wie die primären trigeminalen Afferenzen einzelner Vibrissen. Ähnliche Befunde liegen für die Efferenzen zum VPM und zum *Nucleus colliculus superior* vor (Hoogland et al., 1987; Welker et al., 1988). Über die Funktion dieser Verbindungen ist jedoch wenig bekannt. Denkbar wäre ein modulatorischer Einfluss auf die Weiterleitung der primären somatosensorischen Information zum Barrel-Kortex.

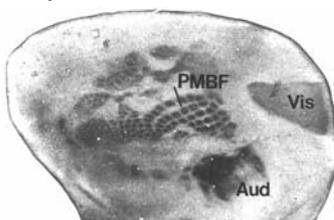
### **Neurotransmitter und deren Rezeptoren im Barrel-Kortex**

Der Barrel-Kortex weist eine Vielfalt verschiedener Neurotransmitter und -modulatoren mit charakteristischen räumlichen und vom Entwicklungsstadium abhängigen Verteilungsmustern auf.

GABA ( $\gamma$ -Aminobutyrat) stellt für den Barrel-Kortex den bedeutendsten inhibitorischen Neurotransmitter dar. Die Verteilung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zeigt innerhalb der ersten postnatalen Lebenswoche ein Barrel-spezifisches Muster, das in den nachfolgenden Wochen wieder verschwindet (Fuchs, 1993).

Der Neurotransmitter Glutamat ist von besonderem Interesse, da er der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des Neokortex sowie der thalamokortikalen Afferenzen ist. Innerhalb der ersten postnatalen Lebenswoche ist in den zentralen Bereichen der Barrels eine hohe Dichte metabotroper Glutamat-Rezeptoren nachweisbar (Blue und Johnston, 1995; Blue et al., 1997). NMDA- (N-methyl-D-aspartat), AMPA- (Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure) und Kainat-Rezeptoren zeigen kein Barrel-spezifisches Muster und werden am Ende der dritten postnatalen Lebenswoche am stärksten exprimiert (Insel et al., 1990; Miller et al., 1990).

Ein weiterer exzitatorischer Neurotransmitter des Barrel-Kortex ist Acetylcholin. Die neuronale Plastizität könnte im somatosensorischen wie auch im visuellen System durch cholinerge Synapsen beeinflusst werden. Acetylcholin führt im Kortex zu einem LTP-ähnlichen („long term potentiation“) Effekt, indem die durch sensorische Eingänge ausgelösten Antworten potenziert werden (Bear und Singer, 1986; Dykes, Buch 1990; Singer, 1990; Juliano und Jakobs, Kap.). Der  $\alpha$ -Bungarotoxin-Typ des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors ist der einzige Subtyp der cholinergen Rezeptoren, der während der ersten beiden postnatalen Wochen ein spezifisches Verteilungsmuster in Form kolumnärer Streifen durch alle Laminae hindurch aufweist (Fuchs, 1989) (Abbildung 1.15).



**Abbildung 1.15**

Färbung zur Darstellung der Acetylcholin-Verteilung im kortikalen Tangentialschnitt einer 10 Tage alten Maus.

Der Neurotransmitter Serotonin kommt in allen primären sensorischen Arealen des Neokortex in hoher Konzentration vor. Sowohl der Serotonin-Rezeptor 5-HT<sub>1B</sub> als auch der Dopamin-Rezeptor D2 zeigen ein zeitlich auf die ersten beiden postnatalen Wochen beschränktes Barrel-spezifisches Verteilungsmuster (D'Amato et al., 1987; Sales et al., 1989; Leslie et al., 1992).

### 1.1.3.2.5 Entwicklung des Barrel-Kortex und der Barrels

Innerhalb der ersten beiden postnatalen Lebenswochen finden im Neokortex entwicklungsbedingt drastische anatomische und physiologische Veränderungen statt. Zellen, die aus der mitotisch aktiven Ventrikulärschicht in den Kortex einwanderten, bilden die kortikale Platte. Aus ihr entwickeln sich durch weitere Migrationsvorgänge die subkortikale Platte und schließlich die charakteristische laminäre Schichtung des Kortex (Abbildung 1.16). Die Neurone nehmen in dieser Zeit an Größe und Komplexität zu und bilden ein nahezu adultes Innervationsmuster aus (Wise und Jones, 1978; van Eden et al., 1990; Burgard und Hablitz, 1993; Sutor und Luhmann, 1995)

Marginalzone	—	Lamina 1
Kortikale Platte (hohe Dichte an Neuronen, eingewandert aus der Ventrikulärzone)	—	Lamina 2, 3, 4
Subkortikale Platte (entwickelt sich aus der kortikalen Platte)	—	Lamina 5, 6
Intermediärzone	—	weiße Substanz
Ventrikulärzone (Zellteilungszone)	—	Ventrikelwand

#### Abbildung 1.16

Undifferenzierte kortikale Schichten (links), die sich zu den entsprechenden Laminae bzw. Strukturen des adulten Neokortex entwickeln (rechts).

Zu der Frage, welche neuronalen Strukturen zur Manifestation der Barrels beitragen, fällt eine direkte räumliche Korrelation zwischen den zu Clustern konzentrierten thalamokortikalen Terminalen (Glomeruli) und den Barrels auf (Bernardo und Woolsey, 1987; Jensen und Killackey, 1987; Chmielowska et al., 1989; Koralek et al., 1988; Nothias et al., 1988; Lu und Lin, 1993). Innerhalb der ersten postnatalen Tage (PND) wachsen die undifferenzierten thalamokortikalen Afferenzen in die Subplatten-Zone des Kortex von Ratte und Maus ein. Dort verzweigen sie sich, so dass einige axonale Äste radial in die kortikale Platte eintreten. Eine Tag bevor die Barrels in der kortikalen Platte erkennbar sind (PND 2), konzentrieren sich die thalamokortikalen Terminalen im basalen Bereich der kortikalen Platte zu Glomeruli. Lage und Anordnung dieser Glomeruli stimmen mit denen der nachfolgend gebildeten Barrels überein (Erzurumlu und Jhaveri, 1990; Jhaveri et al., 1991; Senft und Woolsey, 1991a, b). Barrels bilden sich am PND3 durch das Auftreten zellärmerer Bereiche aus (Rice und van der Loos, 1977). Werden die thalamokortikalen Afferenzen vor ihrem Einwachsen in Lamina 4 experimentell entfernt, bilden sich keine Barrels, während die Entwicklung der Laminae davon unbeeinflusst bleibt (Wise und Jones, 1978). Die schichtartige Gliederung des Kortex stellt daher eine intrinsische Eigenschaft dar, wohingegen das Barrel-Muster von den thalamokortikalen Afferenzen vorgegeben wird. Die normale Ausbildung der thalamokortikalen Glomeruli ist wiederum von einer intakten peripheren Leitungsbahn abhängig (Killackey, 1987;

Woolsey, 1990). Wie schon in Kapitel 1.1.3.2.3 erwähnt, sind Vibrissenmuster nicht nur im Barrel-Kortex, sondern auch in histochemischen Präparaten der trigeminalen Hirnstammkerne und des ventrobasalen Thalamuskerns nachweisbar (Ma 1991, Jaquin et al., 1993; O'Leary et al., 1994). Die Entwicklung dieser histochemischen Muster erfolgt zeitlich nacheinander entsprechend dem Signalübertragungsweg von peripher nach zentral (1. Hirnstamm → 2. Thalamus → 3. Kortex) (Al-Ghoul and Miller, 1993). Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass nicht nur die thalamokortikalen, sondern auch die primären und trigeminothalamischen Afferenzen in ihrem Zielgebiet somatotop separiert enden (Arvidsson und Rice, 1991). So erfolgt eine somatotope Übertragung der Information des Vibrissenmusters von der Peripherie zum Kortex.

In ersten Studien, die ein homomorphes Verhältnis zwischen Vibrissen und Barrels zeigten, wurden einzelne Vibrissenfollikel von neonatalen Mäusen oder Ratten zerstört. Dies hatte zur Folge, dass die entsprechenden Barrels im adulten Kortex nicht auftraten bzw. durch erweiterte angrenzende Gebiete ersetzt wurden (Van der Loos und Woolsey, 1973; Killackey und Belford, 1980; Jeanmonod et al., 1981; Durham und Woolsey, 1984). Um die Ausbildung zytoarchitektonisch getrennter Barrels zu verhindern, müssen die Vibrissenfollikel bzw. der Nervus infraorbitalis in einer sensiblen Phase vor dem ersten Erscheinen der Barrels läsioniert werden (Belford und Killackey, 1980; Jeanmonod et al., 1981). Diese Läsionen verhindern ebenso die Bildung histochemischer Muster in den Hirnstammkernen bzw. dem Thalamus, falls diese vor ihrem Auftreten durchgeführt werden (Durham und Woolsey, 1984; Chiaia et al., 1992a, b). Ungeachtet des zugrunde liegenden Mechanismus sind intakte periphere Strukturen unabdingbar für die zytoarchitektonische Ausbildung der Barrels

#### **1.1.3.2.6 Neuronale Plastizität des Barrel-Kortex**

Von Geburt an bis in das Erwachsenenalter weist der Barrel-Kortex verschiedene Formen der Plastizität auf (Simons und Land, 1987; Fox, 1992; Armstrong-James et al., 1994; Micheva und Beaulieu, 1995; Dolan und Cahusac, 1996; Glazewski et al., 1996 Science). Die morphologische Plastizität, die sich durch Änderungen in der Zytoarchitektur der Barrels manifestiert, ist unabhängig von den sensorischen Information, die die Vibrissen empfangen, und daher aktivitätsunabhängig (Kossut, 1992, 1998). Sie kann durch Läsionierung der Vibrissenfollikel bzw. des Nervus infraorbitalis während einer frühen sensiblen Entwicklungsphase (erste postnatale Lebenswoche) ausgelöst werden (siehe Kapitel 1.1.1.1.5). Funktionelle Plastizität ist dagegen nicht mit Veränderungen der Barrel-Morphologie verbunden und auf keine bestimmte Entwicklungsphase beschränkt. Da diese Form der Plastizität aktivitätsabhängig ist, kann sie bereits durch Abschneiden der Vibrissen oder durch deren verstärkte Stimulation ausgelöst werden (Kossut, 1992, 1998). Sensorische Erfahrung modifiziert die funktionellen Eigenschaften der Neurone des Barrel-Kortex, indem deren RF neu definiert werden und/oder die Amplitude, mit der sie auf die Stimulation einer Vibrisse antworten, verändert wird (Kossut et al., 1988; Fox, 1992; Glazewski et al., 1996). Die Deprivierung der Vibrissen führt in den entsprechenden Barrels („deprivierte Barrels“) zu einer Abschwächung der sensorischen Antwort. In Barrels, deren Vibrissen intakt blieben („undeprivierte Barrels“) wird die Antwort auf sensorische Stimuli dagegen potenziert (Glazewski und Fox, 1996; Glazewski et al., 1998a, b; Skibinska et al., 2000). Diese Effekte beruhen unter anderem auf lokalen Interaktionen innerhalb des Barrel-Kortex (Wallace und Fox, 1999a, b). Konkurrierende Mechanismen zwischen benachbarten sensorischen Eingängen führen zu einem aktivitätsabhängigen Gleichgewicht (Glazewski et al., 1998a, b; Wallace et al., 2001). Die exakte zeitliche Abfolge prä- und postsynaptischer Aktivität entscheidet, ob eine „long term depression“ (LTD) oder „long term potentiation“ (LTP) an den Synapsen ausgeprägt wird (Feldman, 2000). Durch sensorische Deprivierung fehlt die Koinzidenz prä- und postsynaptischer Aktivität, so dass LTP verhindert wird. LTD ist durch ein größeres Zeitfenster charakterisiert und kann so auch bei spontaner prä- und postsynaptischer Aktivität auftreten (Fox, 2000). Ein weiterer Mechanismus

intrakortikaler Plastizität ist die Modulation der lateralen Umfeldhemmung durch Deprivation. Entfernt man die eine zentrale Vibrisse umgebenden Vibrissen wird die sensorische Antwort nach Stimulation der zentralen Vibrisse potenziert, da die Inhibition der umgebenden Vibrissen reduziert ist (Kelly et al., 1999; Fox et al., 2000). Während in adoleszenten Tieren sowohl potenzierende als auch abschwächende Effekte beobachtet werden, sind plastische Veränderungen im adulten Barrel-Kortex auf potenzierende Effekte in L2/3 beschränkt (Glazewski et al., 1996; 1998).

## 1.2 Gegenstand dieser Arbeit

Eine äußerst treffende Beschreibung der Rolle des Neokortex liefert folgendes Zitat:

*The basic task of the cerebral cortex is the processing of sense data and the formation of appropriate motor responses, but to say this disguises the complexity of these tasks and neglects the many other more abstract roles the neocortex plays....The interest is in understanding the structure and function of cortical micro-circuitry in all these different areas, because these microcircuits lie at the heart of the formidable processing power of the cerebral cortex.*  
(Douglas und Martin, 1990)

Die Aufklärung der Struktur und Funktion synaptischer Verschaltungen stellt somit die Grundlage für das Verständnis kortikaler Verarbeitungsmechanismen dar. Mangels geeigneter Visualisierungs- und Applikationstechniken war es bis dato nur in sehr geringem Umfang möglich, synaptisch gekoppelte Neuronenpaare zu lokalisieren. Die Methode der Infrarot-gelenkten Photostimulation ermöglicht es jedoch, Nervenzellen zu visualisieren und einzelne Somata mutmaßlich präsynaptischer Neurone durch photolytische Applikation von Glutamat zu stimulieren. Die daraus resultierenden Antworten des postsynaptischen Neurons können mit der "Patch-Clamp"-Technik abgeleitet werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden mit diesen Techniken die synaptischen Verschaltungen von Pyramidenneuronen im Barrel-Kortex untersucht. Aus diesem Grund wurden die räumlichen Verteilungsmuster von präsynaptischen Neuronen, die auf Pyramidenneurone der Lamina 2/3 bzw. Lamina 5 projizieren, in Relation zu den morphologischen Strukturen des Barrel-Kortex funktionell analysiert. ZUdem wurden die synaptischen Verbindungen dieser gekoppelten Neurone pharmakokinetisch charakterisiert.

Ergänzend zu diesen bis auf Einzell-Ebene hochauflösenden Methoden wurde ein bildgebendes Verfahren angewandt, das die intrinsisch optischen Signale (IOS) des stimulierten neuronalen Gewebes visualisiert. Mit Hilfe dieser „Imaging“-Technik sollten die räumliche Weiterleitung der neuronalen Erregung nach intrakortikaler Stimulation verschiedener kolumnärer und laminärer Strukturen des Barrel-Kortex dargestellt werden. Somit ließen sich die synaptischen Interaktionen einer Vielzahl von Neuronen über größere Bereiche charakterisieren.

Des Weiteren sollten die plastischen Veränderungen dieses neuronalen Netzwerkes nach Modifikation der in den Barrel-Kortex eingehenden sensorischen Information untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde sowohl auf Einzelzell- wie auch auf Mehrzell-Ebene untersucht wie sich sensorische Deprivation während der Synaptogenese (Entfernen der Vibrissen) auf die synaptischen Verschaltungen kortikaler Neurone auswirkt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Deprivierung somatosensorischer Informationen

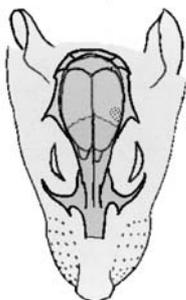
Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden männliche Albinoratten (*Rattus norvegicus familiaris*, Zuchtreihe Sprague Dawley) verwendet. Zur Reduktion der über die Vibrissen eingehenden neuronalen Aktivität, wurden die Tiere sensorisch depriviert. Die Vibrissen wurden zwischen PND 9 und 21 direkt über der Haut abgeschnitten. Dies wurde alle 1-2 Tage wiederholt. Es wurden die Vibrissen, der zur präparierten Hemisphäre kontralateral gelegenen Seite entfernt. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, deren Vibrissen intakt blieben (undeprivierte Tiere).

### 2.2 Präparation thalamokortikaler Hirnschnitte

Für die Experimente wurden Tiere im Alter von 14 - 21 Tagen benutzt, da bei Tieren dieses Alters die erregenden Netzwerke im Neokortex bereits weitgehend ausgebildet sind (Sutor und Luhmann, 1995). Die Verwendung junger Tiere bietet den Vorteil, dass deren Neurone unempfindlicher gegen Anoxie sind und leichter mit der "Patch-Clamp"-Technik abgeleitet werden können als die erwachsener Ratten.

Die Tiere wurden mit Äther bzw. Isofluran narkotisiert und anschließend dekapitiert. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten in gekühlter (2 - 4°C) und mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) gesättigter künstlicher Cerebrospinal-flüssigkeit (ACSF, Zusammensetzung in mM: NaCl 125; KCl 2,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25; MgCl<sub>2</sub> 1; Glucose 25; NaHCO<sub>3</sub> 25; CaCl<sub>2</sub> 2; pH 7,38).

Mit einem sagittal geführten Schnitt durch die Kopfhaut wurde der Schädel freigelegt (Abbildung 2.1). Anschließend erfolgten zwei Transversalschnitte von caudal sowie ein flach geführter Sagittalschnitt entlang der Mittellinie nach rostral. Die so eröffnete Schädelkalotte wurde mit einer Knochenzange nach beiden Seiten bis zum Bregma abgehoben. Das Gehirn konnte nachdem die Nervi optici und des verlängerten Rückenmark durchtrennt waren mit einem abgerundeten Spatel aus dem Schädel herausgelöst werden.



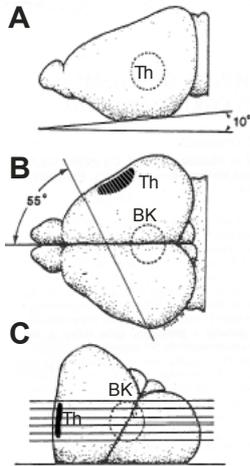
**Abbildung 2.1**

Aufsicht auf den Schädel einer Ratte  
oben: kaudal, unten: rostral

Von kaudal nach rostral ist mittig die Sagittallinie zu sehen.

Um die morphologischen Strukturen der Barrels im Hirnschnitt klar darzustellen sowie die verbindenden Fasern zwischen dem ventrobasalen Nukleus des Thalamus (VPM) und dem Barrel-Kortex zu erhalten, wurde eine von Agmon und Connors (1991) entwickelte Präparation angewandt (Abbildung 2.2). Das Gehirn wurde hierfür mit der Basis nach unten und dem rostralen Ende abwärts weisend auf einer 10°-Rampe positioniert. Nach einem vertikalen Schnitt in einem Winkel von 55° zur sagittalen Mittellinie wurde der Gehirnblick mit der Schnittfläche auf einen Plexiglasquader geklebt. Die Schnitt- und

Klebefläche wurde so durch zwei Winkel mit unterschiedlichen Achsen definiert. Mit einem Vibratom (FTB) wurden für Einzelzellableitungen 300  $\mu\text{m}$  bzw. für die Ableitung intrinsisch optischer Signale 400  $\mu\text{m}$  dicke Sagittalschnitte angefertigt (Klingen: Vibratom Blades, TIM Ltd.). Die fertigen Hirnschnitte wurden in Gefäße mit Carbogen-gesättigter ACSF überführt und 20 min bei 34-36 °C inkubiert. Anschließend wurden sie bis zum Überführen in die Ableitkammer bei Raumtemperatur (22 - 24 °C) aufbewahrt.



**Abbildung 2.2** Präparation thalamokortikaler Hirnschnitte

**A** Laterale Ansicht des Rattenhirns, das auf einer Rampe mit 10° Neigung liegt.

**B** Aufsicht auf das Rattenhirn von dorsal. Die Linie deutet den vertikalen Schnitt mit 55° zur Sagittalebene an.

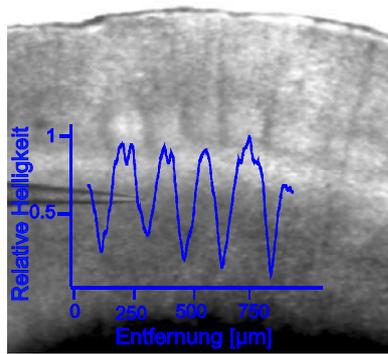
**C** Rostral aufgeklebtes Rattenhirn mit horizontalen Schnittlinien  
BK Barrel-Kortex, Th Thalamus (verändert nach Agmon und Connors, 1991)

## 2.3 Visualisierung der Barrels

Die Barrels in Lamina 4 lassen sich aus den in Kapitel 1.1.3.2.1 genannten Gründen im nativen thalamokortikalen Hirnschnitt ohne jegliche histologische Färbetechniken darstellen. Sowohl die Hellfeld- (HF-Kondensator, Numerische Apertur N.A. 0.32) als auch die Dunkelfeldmikroskopie (DF-Kondensator, N.A. 0.32; Axioskop FS, Zeiss) eignen sich bei geringer Vergrößerung (2.5x, Neofluar, N.A. 0.075, Zeiss) zur Visualisierung der Barrelgrenzen sowie der verschiedenen Laminae des Barrel-Kortex.

### 2.3.1 Durchlicht-Hellfeldmikroskopie

Ein durch Hellfeldbeleuchtung gewonnenes Übersichtsbild des Barrel-Kortex diene zur Korrelation der neuroanatomischen Strukturen mit den elektrophysiologischen Daten der infrarotgelenkten Photostimulation (siehe Kapitel 2.4) und „Patch-Clamp“-Technik, die am selben Messtand durchgeführt wurden. Die Lage der abgeleiteten postsynaptischen Neurone und der mittels Photostimulation synaptische Konnektivitäten aufweisenden präsynaptischen Neurone konnten so auf die laminäre und kolumnäre Organisation des Barrel-Kortex übertragen werden. Zu diesem Zweck wurde das Übersichtsbild des Barrel-Kortex mittels eines Digitalisierungssystems (Argus-20, Hamamatsu Photonics) direkt in den Computer eingelesen und mit einem absoluten Referenzpunkt markiert, auf den sich die Lage der abgeleiteten und stimulierten Neurone bezog. Um die Grenzen der Barrelstrukturen zu quantifizieren, wurden Graustufenprofile (Pixelintensität als Funktion ihrer Lokalisation im Graustufenbild) der Barresseiten und -höhlen erstellt. Nach deren Glättung („sliding average“, Fensterbreite 15 Pixel) wurde die halbmaximale Helligkeit der Grauwerte als Grenze zwischen Barresseite und -höhle definiert (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3**

Hellfeldbild des Barrelkortex mit überlagertem Graustufen-Profil. In der rechten Bildhälfte ist die Ableitelektrode zu erkennen.

### 2.3.2 Dunkelfeldmikroskopie

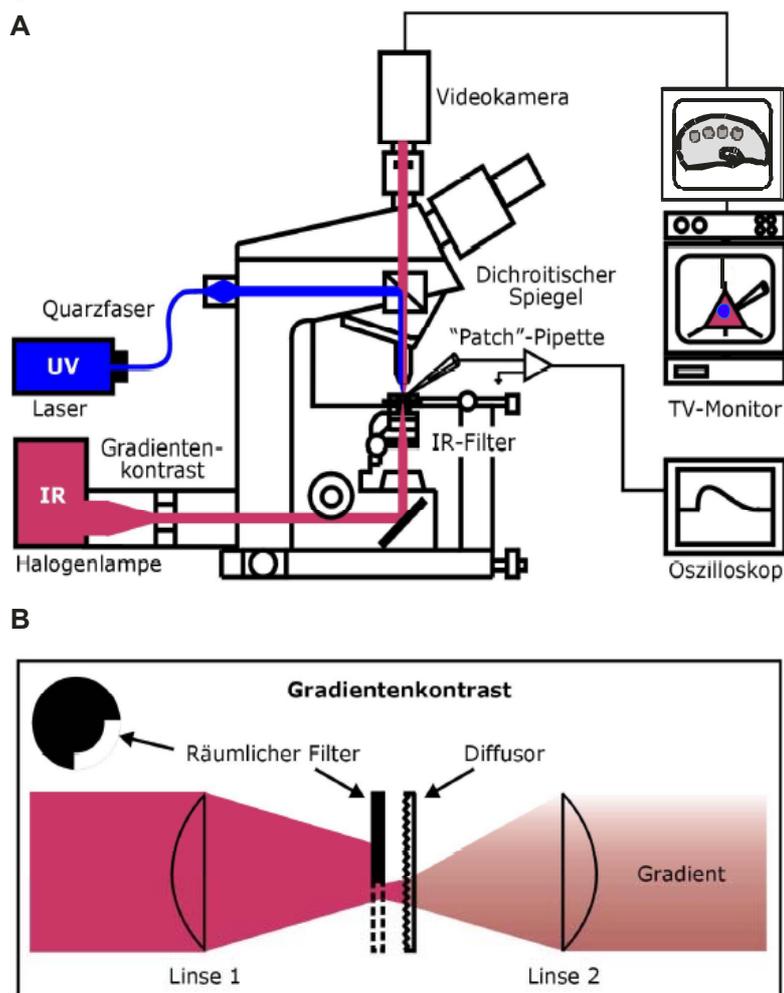
Im Gegensatz zur Hellfeldmikroskopie gelangen bei der Dunkelfeldmikroskopie nur die vom Objekt gebeugten Strahlen in das Objektiv. Der dafür benötigte Dunkelfeld-Kondensator (N.A. 0.32) hatte eine zentrale, konzentrische Blende von 10mm Durchmesser. Das so gewonnene Dunkelfeldbild des Barrel-Kortex in Kombination mit infrarotem Licht diente als Grundlage und Hintergrundbild zur Detektion intrinsisch optischer Signale (IOS) (siehe Kapitel 2.5.1).

## 2.4 Infrarotgelenkte Photostimulation

Die Infrarot-gelenkte Photostimulation (Abbildung 2.4 A) ist eine Kombination aus Infrarot-Videomikroskopie und Photostimulation. Mit dieser Technik können an einzelnen visualisierten Neuronen u.a. Neurotransmitter photolytisch freigesetzt werden. Da diese Technik eine sehr große räumliche und zeitliche Auflösung besitzt, ist sie gut geeignet, synaptische Transmissionsvorgänge in neuronalen Netzwerken zu untersuchen.

### 2.4.1 Infrarot-Videomikroskopie

Mit Hilfe der Infrarot (IR)-Videomikroskopie können Soma, Dendriten und Axon einzelner Nervenzellen im lebenden Hirnschnitt sichtbar gemacht werden (Dodt und Ziegglängsberger, 1990, 1994). Das grundlegende Prinzip der IR-Mikroskopie besteht darin, dass langwelliges IR-Licht biologisches Gewebe leichter durchdringt als sichtbares Licht (Svaasand und Ellingsen, 1983; MacVicar, 1984). Die Verwendung von langwelligem Licht hat einen Verlust an räumlicher Auflösung zur Folge, die jedoch in Kauf genommen werden kann, da entsprechend feine Strukturen aufgrund des geringen Kontrastes in ungefärbten Präparaten ohnehin nicht sichtbar gemacht werden können.



### Abbildung 2.4

Kombination von Infrarot-gelenkter Photostimulation und „Patch-Clamp“-Ableitungen in Hirnschnitten des Barrel-Kortex der Ratte

**A** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

**B** Schematische Darstellung des Gradientenkontrastverfahrens.

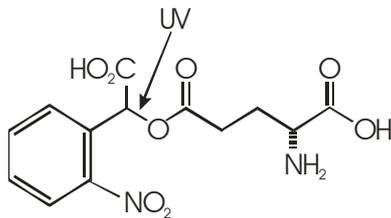
Durch Viertelfeldbeleuchtung mit einem nachgeschalteten Diffusor wurde das Streulicht im Hirnschnitt minimiert. Dadurch wurden Visualisierungstiefe und Kontrast erhöht. (verändert nach Eder, 2000)

Durch einen zwischen Halogenlampe (100W) und Kondensor positionierten Infrarot-Interferenzfilter (Bandpassfilter  $\lambda_{\max} = 780 \pm 50\text{nm}$ ) gelangte IR-Licht mit einer Wellenlänge von  $780 \pm 50\text{nm}$  in den Strahlengang des Mikroskops (Axioskop FS, Zeiss). Das Mikroskop war mit einem Öl-Immersionkondensor (N.A. 1.4, Zeiss) sowie einem 60-fach vergrößernden Wasser-Immersionobjektiv (LUM PlanFI, N.A. 0.90, Olympus) ausgestattet. Durch einen Strahlenteiler wurde das Bild gleichzeitig auf zwei infrarotsensitive Videokameras (Hamamatsu C2400, Hamamatsu Photonics) projiziert. Ein zwischen Mikroskop und einer der beiden Videokameras positionierter Vergrößerungstubus vergrößerte das Bild um den Faktor 4. Eine Kontrastverstärkung wurde zum einen durch eine in die Videokameras eingebaute analoge Kontrastverstärkung und zum anderen durch ein Gradientenkontrast (GC)-Verfahren (Dodt et al., 1998) erreicht. Das Prinzip dieser Technik ist die Minimierung von Streulicht sowie die Erzeugung eines Beleuchtungsgradienten in zwei orthogonalen Richtungen. Im

Vergleich zum Differential-Interferenzkontrast nach Nomarski (DIC) wird mit dem Gradientenkontrast (Abbildung 2.4 B) im Hirnschnitt eine um ungefähr 50% größere Visualisierungstiefe sowie ein höherer Kontrast erreicht. Da für das GC-System keine optischen Elemente hinter dem Objektiv platziert werden müssen, gelangt auch bei hohen Vergrößerungen ausreichend Licht in die Kameras. Einzelbilder wurden während des Experiments über das o.g. Digitalisierungssystem zur Bildnachbearbeitung eingelesen. Dadurch konnten elektrophysiologische und morphologische Daten einzelner Neurone miteinander korreliert werden.

## 2.4.2 Laser-Photostimulation

Das Grundprinzip der Laser-Photostimulation ist die photolytische Freisetzung einer biologisch aktiven Substanz aus einer durch Veresterung inaktivierten Verbindung („caged“ Verbindung). Durch energiereiches ultraviolettes (UV) Licht wird die kovalente Esterbindung photolytisch gespalten und das biologisch aktive Molekül freigesetzt (Abbildung 2.5).

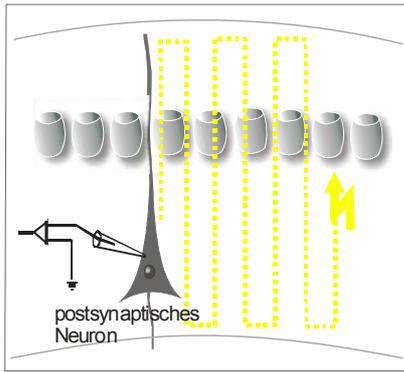


**Abbildung 2.5** "Caged" Glutamat

Der Neurotransmitter ist durch Veresterung inaktiviert. Durch UV-Licht wird die Esterbindung (Pfeil) gespalten. Das dadurch freigesetzte L-Glutamat kann nun an spezifische Rezeptoren binden und diese aktivieren.

Dieser Prozess verläuft sehr schnell und führt zu einem sofortigen Anstieg der Konzentration von Neurotransmittern oder sekundären Botenstoffen (McCray und Trentham, 1989; Adams und Tsien, 1993; Hess et al., 1995). Durch die Fokussierung des UV-Lichtes auf einen kleinen Punkt kann ein Neurotransmitter sehr lokal freigesetzt werden (O'Neill et al., 1990; Callaway und Katz, 1993; Wang und Augustine, 1995).

Zur Photolyse von caged Glutamat wurde in der vorliegenden Arbeit ein Argon-Ionenlaser (Enterprise II, Coherent) verwendet. Die UV-Strahlung des Lasers wurde über eine Quarzfaser in den Auflichtstrahlengang des Mikroskops eingekoppelt und über einen dichroitischen Strahlenteiler (FT 460) in das Objektiv eingespiegelt. Durch den dichroitischen Spiegel gelangte ausschließlich Licht mit einer Wellenlänge von <460 nm auf die Hirnschnitte. Der Laser emittierte UV-Licht mit einer Wellenlänge von 351-364nm. Durch das Objektiv wurde die Strahlung des Lasers im Brennpunkt des Objektivs und somit in die Fokusebene gebündelt. Um spezifisch neuronale Somata und nicht deren Dendriten zu stimulieren wurde ein resultierender Lichtpunkt mit einem Durchmesser von 8 µm gewählt (siehe Kapitel 3.2.1). Um des weiteren zu verifizieren, dass ausschließlich das Soma eines präsynaptischen Neurons stimuliert wird, wurden nur visualisierte Somata als präsynaptisch deklariert, deren Stimulation eine maximale postsynaptische Antwort lieferten. Die Applikation von Glutamat in der nahen Umgebung dieses Somas (ringförmiger Bereich mit Radius von 10µm) durfte keine postsynaptische Antwort liefern. Mittels der Mikromanipulatoren (LN mini 25, Luigs und Neumann) konnte das Mikroskop relativ zum Hirnschnitt bewegt werden, wodurch es möglich war Neurone in beliebiger Entfernung zum abgeleiteten Neuron zu stimulieren. Ausgehend vom Ableitort wurde das Mikroskop in mäanderförmigen Schleifen (Abbildung 2.6) mit einem lateralen Abstand von 20–25µm über alle Laminae des Barrel-Kortex bewegt. Die maximale laterale Entfernung vom Ableitort betrug 1mm.

**Abbildung 2.6**

Abrastern des Barrel-Kortex mit Hilfe der Photoabstimmung zum Nachweis präsynaptischer Neurone.

Über eine Steuereinheit (Luigs und Neumann) und einen Computerprogramm (mpc Software, Luigs und Neumann) war es möglich, die Entfernung zu einem zuvor festgelegten Referenzpunkt im Übersichtsbild des Hirnschnittes (siehe Kapitel 2.2.1) auf  $1\mu\text{m}$  genau zu messen. So konnte die relative Lage der präsynaptischen zu den postsynaptischen Neuronen sowie die absolute Lage der Neurone im Barrel-Kortex des Hirnschnittes bestimmt werden. Die Dauer der applizierten UV-Lichtpulse konnte mit einem „Shutter“ (Uniblitz) reguliert werden. Der Shutter wurde mit Hilfe eines Computers mit entsprechender Software (Pulse, HEKA) über einen AD-Wandler (ITC 16, HEKA) getriggert. Seine kürzeste einstellbare Öffnungszeit betrug 3ms. Die Intensität der ermittelten UV-Strahlung konnte auf einen Wert zwischen 0-90mW eingestellt werden und wurde so justiert, dass am abgeleiteten Neuron 1 Aktionspotential generiert wurde. So wurde die Wahrscheinlichkeit minimiert, polysynaptische Schaltkreise über mehrere Neurone hinweg zu aktivieren.

### 2.4.3 Caged Substanzen

Für die Versuche wurde  $\gamma$ -CNB( $\alpha$ -carboxy-2-nitrobenzyl)-caged Glutamat (Molecular Probes) in einer Konzentration von 0,25mM verwendet. Vorteile der  $\gamma$ -CNB-Gruppe gegenüber anderen „caging“ Gruppen sind eine hohe „uncaging“ Rate und die Wasserlöslichkeit der „caged“ Substanzen. Weiterhin sind (CNB)-caged Verbindungen äußerst inert. Im Hirnschnitt ist caged Glutamat physiologisch inaktiv. Durch ausreichende Beleuchtung mit UV-Licht wird physiologisch aktives Glutamat innerhalb von  $21\mu\text{s}$  zu 90% mit einer Quantenausbeute von 14% freigesetzt (Wieboldt et al., 1994). Die maximal erreichbare freie Konzentration von Glutamat betrug deshalb  $25\mu\text{M}$ . Eine spontane Spaltung der caged Verbindung, zum Beispiel durch das Raumlicht, könnte zu einer Desensibilisierung der entsprechenden Rezeptoren führen. Die Stabilität der (CNB)-caged Verbindungen wurde von Eder et al. (2000) untersucht, indem die Amplituden und Anstiegszeiten synaptisch ausgelöster EPSPs vor und nach dem Einwaschen von  $\gamma$ -(CNB)-caged Glutamat (0,5mM) analysiert wurden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass weder die Amplitude noch die Anstiegszeit (20-80%) durch caged Glutamat signifikant beeinflusst wurde. Weiterhin konnte keine Veränderung des Ruhemembranpotentials sowie der Spontanaktivität im Hirnschnitt beobachtet werden. Eine Desensibilisierung der entsprechenden Rezeptoren kann deshalb ausgeschlossen werden.

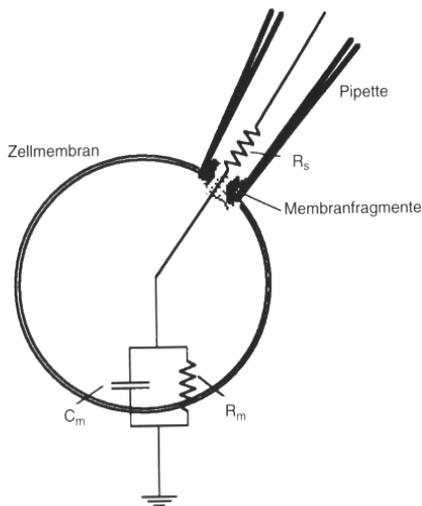
## 2.5 Elektrophysiologie

### 2.5.1 Versuchsaufbau

Für die elektrophysiologischen Experimente war das verwendete IR-Mikroskop mit einem System motorisierter Mikromanipulatoren (LN mini 25, Luigs und Neumann) ausgestattet. Hierdurch konnten das Mikroskop, die Ableitkammer und die Patch-Pipette unabhängig voneinander in alle drei Raumrichtungen bewegt werden. So war es möglich, nachdem die Ableitung eines Neurons etabliert war, den Hirnschnitt nach mutmaßlich präsynaptischen Neuronen zu durchsuchen. Für die Versuche wurde eine Ableitkammer vom „submerged“-Typ (Alger, 1984) verwendet, die für die Vitalität der Schnitte und für Ganzzelleableitungen vorteilhaft ist (Blanton et al., 1989). Zur Fixierung der Hirnschnitte am Kammerboden diente ein mit dünnen Nylonfäden bespannter Platinrahmen. Die Kammer wurde mit Carbogen-gesättigter ACSF durchspült, wodurch eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Neurone gewährleistet wurde. Der Zufluss aus einem Vorratsgefäß erfolgte mittels Schwerkraft und wurde auf einen Wert von ca. 3ml pro Minute eingestellt. Der Abfluss erfolgte ebenfalls über die Schwerkraft. Kurz vor dem Ableiten eines Neurons, wurde auf ein zusätzliches Zu- und Ablaufsystem umgeschaltet. Über dünne Teflonschläuche, die über eine Schlauchpumpe liefen, wurde ein kleines Volumen (4ml) ACSF rezirkuliert und reoxygeniert. Dieses Rezirkulationssystem wurde aus Kostengründen für die Experimente mit den sehr teuren caged Substanzen eingesetzt. Es ermöglichte stabile Ableitungen für 1-3h. Die verwendeten caged Verbindungen und Neuropharmaka wurden nach Aufzeichnung der Strom-Spannungsbeziehung des abgeleiteten Neurons der rezirkulierenden ACSF zugesetzt. Es dauerte ungefähr 10min, bis die Substanzen vollständig eingewaschen waren. Nach dieser Zeit konnte mit den Photostimulationsexperimenten begonnen werden.

### 2.5.2 Ganzzelleableitung

Die Ableitung einzelner kortikaler Pyramidenneurone des Barrel-Kortex der Ratte erfolgte mit der „Patch-Clamp“-Technik (Stuart et al., 1993). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Ableitung mit scharfen Mikroelektroden besteht vor allem in dem sehr hohen Abdichtungswiderstand zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran im Bereich von  $G\Omega$  („Giga-seal“). Das daraus resultierende gute Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht die Messung sehr kleiner Ströme beziehungsweise Potentialänderungen (Neher et al., 1978). Weiterhin kann die elektrische Aktivität ganzer Zellen in der so genannten Ganzzell- („Whole-Cell“-) Konfiguration gemessen werden (Blanton et al., 1989; Edwards et al., 1989) (Abbildung 2.7). Da für die Ganzzelleableitung normalerweise niederohmige Pipetten verwendet werden, können der Pipettenlösung zugesetzte Pharmaka gut in die Zelle diffundieren. Dies ermöglicht eine intrazelluläre Blockade von Ionenkanälen oder eine Pufferung von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch Komplexbildner. Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Ableitungen erfolgten in der „Whole-Cell“-Konfiguration.



**Abbildung 2.7** Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung.

Nach dem Durchbrechen der Membran erhält man die „Whole-Cell“-Konfiguration. Dabei werden Membranfragmente und anderes Zellmaterial in die Nähe der Pipettenmündung gesaugt, was den Serienwiderstand  $R_s$  erhöht.

$R_m$  Membranwiderstand,  $C_m$  Membrankapazität.

(verändert nach Numberger und Draguhn, 1996)

### 2.5.3 Pipetten

Die Pipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Innenfilament (Clark, Electromedical Instruments) mit einem Horizontalziehgerät (DMZ-Universalpuller, Zeitz) gezogen und anschließend hitzepoliert. Der Innendurchmesser der Kapillaren betrug 0,86mm, der Außendurchmesser 1,5mm. Durch Veränderung verschiedener Parameter am Ziehgerät konnten der Spitzendurchmesser und die Spitzenform der Pipetten für die jeweilige Anwendung optimal eingestellt werden. Die Intrazellulärlösung hatte folgende Zusammensetzung (in mM): K-Gluconat 130; KCl 5; HEPES 10; EGTA 0,5; Mg-ATP 2; Glucose 5. Der pH-Wert wurde mit 1 molarer KOH auf 7,2 eingestellt. Die Osmolarität betrug 260 – 270mosM (Andreasen und Hablitz, 1994). Für die Ableitungen der Neurone am Soma betrug die Gleichstromwiderstände der gefüllten Pipetten 4–7M $\Omega$ . Dies entspricht einem Spitzendurchmesser von ungefähr 1 $\mu$ m.

### 2.5.4 Etablierung der Ganzzelleableitung

Die Neurone wurden in der „Whole-Cell“-Konfiguration im Brücken-Modus abgeleitet. Über das Prinzip der so genannten Wheatstoneschen Brücke kann bei dieser Art der Ableitung gleichzeitig die Spannung gemessen und Strom in das Neuron injiziert werden. Außerdem ermöglicht sie ein Abgleichen des Pipettenwiderstandes. Die mit Intrazellulärlösung gefüllten Pipetten wurden über einen chlorierten Silberdraht mit dem Verstärker (SEC 1L, npi) elektrisch verbunden. Der Stromkreis war über ein Silber/Silberchloridpellet im Bad geschlossen. Die abgeleiteten Potentiale (Brückenmodus) wurden mit einem AD-Wandler (ITC 16, HEKA) digitalisiert und mit einem Macintosh-Computer und der entsprechenden Software (Pulse, HEKA) aufgezeichnet. Um ein Verstopfen der Pipette im Hirnschnitt zu verhindern, wurde ein Überdruck (ungefähr 110cm H<sub>2</sub>O) angelegt. Die Dosierung des Drucks erfolgte extern über einen Druckluftregler. Nachdem im Brücken- und „Current-Clamp“-Modus der Widerstand und die Kapazität der Elektrode abgeglichen worden waren, wurde die Pipette vorsichtig der Zellmembran angenähert und dann mit langsam stärker werdendem Unterdruck die „Cell-Attached“-Konfiguration hergestellt, um anschließend den Membranbereich unter der Pipettenspitze zu durchbrechen. Der niedrige Zugangswiderstand zwischen Elektrode und Neuron erlaubt die freie Passage von Ionen. Anschließend wurden der Serienwiderstand und die Serienkapazität abgeglichen und die Strom-Spannungs-Kennlinie der Zelle aufgezeichnet.

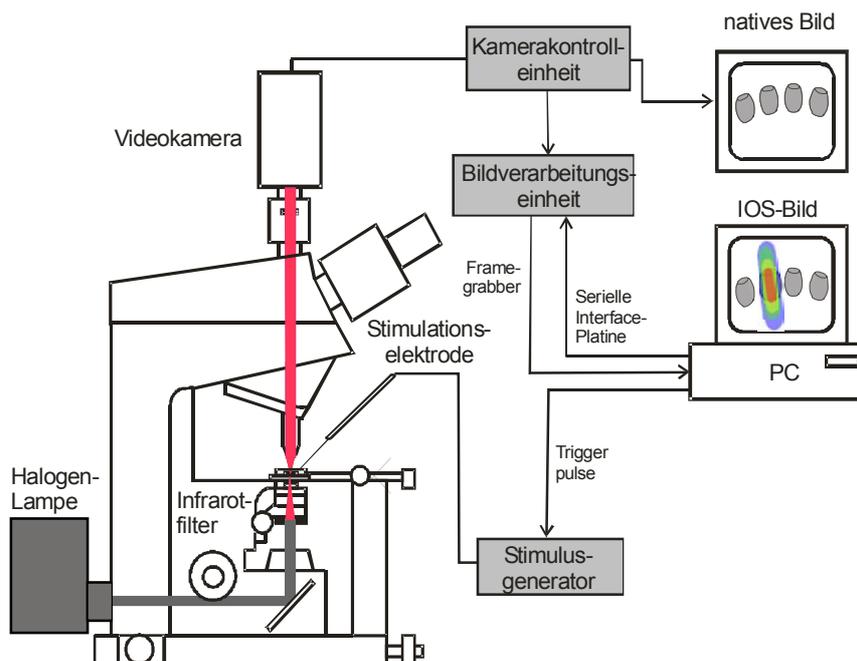
Für die simultane Ableitung eines zweiten Neurons, das mittels Photostimulation als präsynaptisches Neuron identifiziert wurde, wiederholte sich prinzipiell dieselbe Vorgehensweise. Alle mechanischen Erschütterungen wurden dabei minimiert. Die Ableitkammer wurde nicht mehr bewegt und der Überdruck in der Pipette möglichst gering gehalten. Die abgeleiteten Potentiale wurden mit einem zweiten Verstärker (SEC 10 LX, npi) abgeleitet, ebenso digitalisiert und über einen zweiten Spannungs-Kanal aufgezeichnet. Alle Ableitungen erfolgten bei Raumtemperatur (22-24°C).

## 2.6 Intrinsisch optische Signale

Elektrische Stimulation induziert in neuronalem Gewebe lebender Hirnschnitte eine Abnahme der Reflektion bzw. Zunahme der Transparenz, was auf eine reduzierte Lichtstreuung hinweist (Kreisman et al., 1995; Dodt et al., 1996; Andrew et al., 1997; Aitken et al., 1999; Tao, 2000; Fayuk et al., 2002). Dieses als intrinsisches optisches Signal (IOS) bekannte Phänomen wurde schon früh für isolierte Nervenfasern (Hill und Keynes, 1949) sowie an isolierter Retina (Gouras, 1958) beschrieben. Das IOS ist auf das Anschwellen von Zellen aufgrund eines den Ionen nachfolgenden Wassereinstroms zurückzuführen. Dies führt zu einer Reduktion des extrazellulären Raumes (Holthoff und Witte, 1996, 1998; Aitken et al., 1999; Johnson et al., 2000; Fayuk et al., 2002). Ob die dafür verantwortlichen Zellen Neurone oder auch Astrozyten sind, ist noch ungeklärt (Andrew und McVicar, 1994; Holthoff und Witte, 1998, Aitken et al., 1999). Mehrere Befunde sprechen außerdem dafür, dass Änderungen der Zellvolumina nicht die einzige Erklärung für das IOS sind (Aitken et al., 1999; Fayuk et al., 2002).

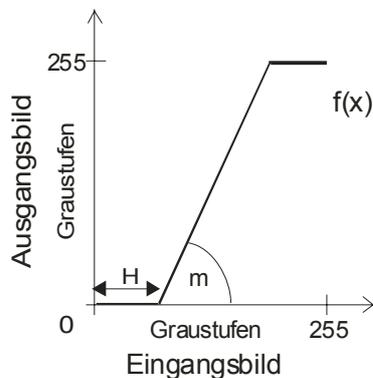
### 2.6.1 Visualisierung des IOS

Zur Visualisierung der kleinen optischen Veränderungen wurden verschiedene Verfahren, die das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern, angewandt. Als optische Grundlage diente die schon oben beschriebene Dunkelfeldmikroskopie (siehe Kapitel 2.2.2).



**Abbildung 2.8**

Schematische Darstellung der bildverarbeitenden Einheiten zum Aufzeichnen des IOS. Hierzu wurde jedoch nicht weißes, sondern IR-Licht verwendet (Bandpassfilter  $\lambda_{\max} = 780 \pm 50\text{nm}$ ) (siehe Kapitel 2.3.1). Da langwelliges Licht im Gewebe weniger gestreut wird als kurzwelliges, sind IOS mit IR-Licht stärker ausgeprägt (MacVicar und Hochman, 1991). Das IOS wird über eine infrarotsensitive Videokamera (Hamamatsu C2400, Hamamatsu Photonics) aufgezeichnet (Abbildung 2.8). Durch die Kontrolleinheit der Kamera wird ein analoges Kontrastverstärkungssystem mit multidirektionaler Schattierungskorrektur angesteuert. Daran angeschlossen ist ein komplexes Bildverarbeitungssystem (Argus 20, Hamamatsu Photonics), das die Bilder in digitaler Form weiterverarbeitet, aber analog ausgibt. Zur Generierung eines Hintergrundbildes in Echtzeit werden 64 Bilder des nicht-stimulierten Hirnschnittes aufgezeichnet und gemittelt. Nach der Stimulation werden 10 weitere Bilder des erregten Hirnschnittes mit einer zeitlichen Verzögerung von jeweils 1,5s akquiriert. So lässt sich die zeitliche Veränderung des IOS darstellen. Jedes dieser Einzelbilder wird vom gemittelten Hintergrundbild subtrahiert, wodurch ein Differenzbild entsteht, das nur die zeitlichen Änderungen  $\Delta$  wiedergibt. Zu diesem Differenzbild wird ein konstanter Betrag addiert, so dass sich nur positive Intensitätswerte ergeben. Danach wird das Differenzbild digital verstärkt, indem die Bildmatrix mit einer Kantenfunktion multipliziert wird (Abbildung 2.9).

**Abbildung 2.9**

Digitale Kontrastverstärkung durch Multiplikation der Bildmatrix mit einer Verstärkungsfunktion  $f(x)$  der Steigung  $m$  und dem x-Achsenabschnitt  $H$ .

Das verstärkte Differenzbild, dessen Entstehung „online“ auf einem Monitor beobachtet werden kann, wird ebenso wie das originale IR-Dunkelfeldbild des Hirnschnittes über eine Frame-Grabber-Karte (611 PCI mit 8 Bit, 256 Graustufen, 768x576 Pixel, Sensoray Inc.) an den Computer übertragen. Dort wird es tief-pass gefiltert (3x3 Gauß-Filter) und in Falschfarben von blau (geringe Intensität) bis rot (hohe Intensität) codiert. Zuletzt wird das farbcodierte IOS-Differenzbild einem IR-Dunkelfeldbild des Barrel-Kortex überlagert, um das IOS mit den anatomischen Strukturen des Hirnschnittes korrelieren zu können. Zu diesem Zweck wurde die Intensität jedes Pixels  $I_{IOS}$  der Bildmatrix mit einem Schwellenwert  $S$  verglichen. War  $I_{IOS} > S$ , wurde das jeweilige Graustufen-Pixel des IR-Dunkelfeldbildes durch ein entsprechendes farbiges Pixel des IOS-Bildes ersetzt. So erhielt man ein Mischbild, in dem die Bereiche, die nach elektrischer Stimulation überschwellige Änderungen des IOS aufwiesen, farbcodiert im morphologisch strukturierten Graubild des Hirnschnittes auftraten. Durch eine geeignete Wahl der Schwelle  $S$  konnte störendes Hintergrundrauschen, wie es zum Beispiel durch leichte Vibrationen entsteht, weggefiltert werden. Um störende Vibrationen und Reflektionen der Flüssigkeitsoberfläche über dem Hirnschnitt auszuschalten, wurde dem Objektiv eine Art „Taucherbrille“ (Immersionsskappe) aufgesetzt, die in die ACSF eintauchte.

**2.6.2 Versuchsaufbau**

Der Versuchsaufbau zur Messung des IOS entspricht bezüglich der Ableitkammer, dem ACSF-Zirkulationssystem und den Manipulatoren dem in Kapitel 2.4.1 schon

beschriebenen experimentellen Versuchsaufbau. Die optischen Anforderungen der IR-Dunkelfeldmikroskopie wurden in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

### **2.6.3 Extrazelluläre Stimulation**

Um ein IOS zu evozieren, wurden durch elektrische Stimulation synaptische Transmissionsvorgänge im Hirnschnitt ausgelöst. Hierzu wurden bipolare, konzentrische Stimulationselektroden verwendet. Zur intrakortikalen Stimulation wurden sehr feine Mikroelektroden (Platin/Iridium Cluster-Elektrode CE2B75, Durchmesser 12,5µm; FHC Inc.) im Barrel-Kortex platziert. So konnten lokal begrenzte Areale einzelner Laminae und Kolumnen sowie einzelne Barrels stimuliert werden. Die Stimulationselektrode war mit einem externen Stimulationsgerät (isolierter Stimulator Typ 2533, Devices Instruments LTD) verbunden, das durch den Computer getriggert wurde. Die extrazelluläre Stimulation erfolgte 1s bevor das erste IOS-Bild akquiriert wurde (Spannung 2-8V; Pulslänge 0,2ms; Frequenz 50Hz; Dauer 2s).

## **2.7 Auswertung und Statistik**

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Computerprogrammen Photoshop (Adobe), Pulse (HEKA), Igor Pro (WaveMetrics Inc.) und Excel (Microsoft). Für die Statistik wurde das Programm SPSS (SPSS Inc.) und SigmaStat (Microsoft) verwendet. Mittelwerte werden grundsätzlich mit dem zugehörigen S.E.M. („standard error of the mean“)-Wert angegeben. Für die Ergebnisse der neuronalen Kartierungen (Kapitel 3.2.2) wurde eine Korrektur des Signifikanzniveaus vorgenommen (Bonferonni Adjustierung). Die entsprechenden statistischen Tests werden jeweils angegeben.

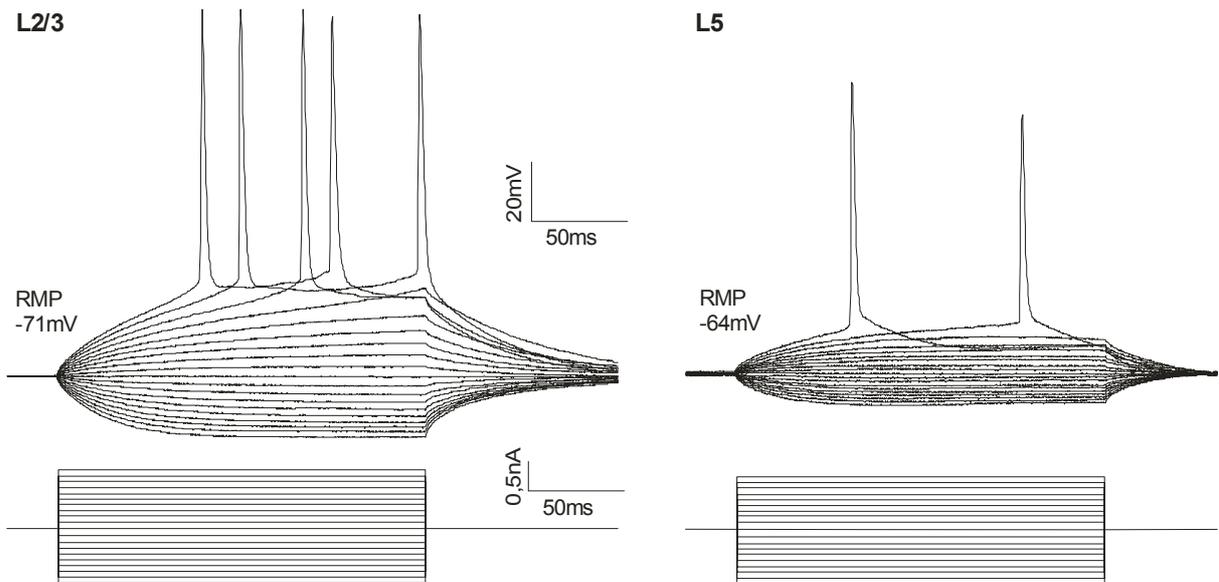
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Eigenschaften neokortikaler Pyramidenneurone der Lamina 2/3 und 5

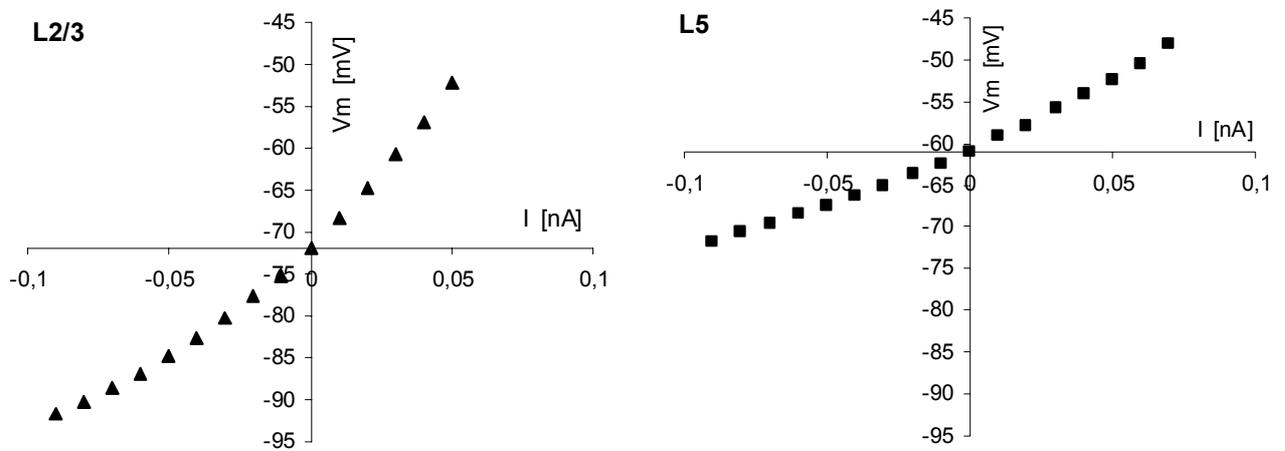
Die im Folgenden dargestellten elektrophysiologischen Befunde wurden an 76 Pyramidenneuronen der Lamina 2/3 (L2/3) und 73 Pyramidenneuronen der Lamina 5 (L5) des Barrel-Kortex der Ratte erhoben. Die einzelnen Neurone wurden nach folgenden Kriterien aus einer größeren Anzahl von Ableitungen ausgewählt: **(1)** Der Wert des Ruhemembranpotentials (RMP) musste negativer als  $-65\text{mV}$  (L2/3) bzw.  $-58\text{mV}$  (L5) sein. **(2)** Das Aktionspotential (AP) musste bei den somatischen Ableitungen eine Amplitude von mehr als  $65\text{mV}$  besitzen. Vergleichbare Kriterien werden auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet (Burgard und Hablitz, 1993; Stuart und Sakmann, 1994; Gottlieb und Keller, 1997).

Das vom Soma abgeleitete RMP lag für L2/3 Neurone im Mittel bei  $-70 \pm 0,8\text{mV}$ , für L5 Neurone dagegen bei  $-61 \pm 0,9\text{mV}$  und weist somit einen signifikanten Unterschied auf (Mann-Whitney-Wilcoxon-Test,  $p < 0,01$ ). Nachdem sich die Ableitung stabilisiert hatte, wurde eine Strom-Spannungsbeziehung des Neurons aufgezeichnet. Hierzu wurden Rechteckstimpulse von  $160\text{ms}$  Dauer unterschiedlicher Amplitude und Polarität über die Elektrode in das Neuron injiziert (Abbildung 3.1A). Bei der Auswertung wurde die Auslenkung des Membranpotentials am Plateauwert  $150\text{ms}$  nach Beginn der Strominjektion in  $\text{mV}$  gemessen und gegen die Stärke der Strominjektion in  $\text{nA}$  gesetzt (Abbildung 3.1B). Aus der Steigung der Strom-Spannungskurve konnte der Eingangswiderstand ( $R_N$ ) der Nervenzelle am Ruhemembranpotential berechnet werden. Im Mittel lag  $R_N$  für L2/3 Neurone bei  $131 \pm 9,2\text{M}\Omega$  ( $n=59$  Neurone), für L5 Neurone dagegen bei  $113 \pm 6,1\text{M}\Omega$  ( $n=51$  Neurone), so dass sich ein statistisch signifikanter Unterschied ergab (Students t-Test,  $p=0,026$ ). Weiterhin wurde die anormale Rektifizierung bestimmt. Sie berechnete sich aus dem Verhältnis der Steigung der Regressionsgeraden für die Werte im de- und hyperpolarisierten Bereich. Im Mittel betrug die anomale Rektifizierung für L2/3 Neurone  $1,30 \pm 0,04$  ( $n = 59$  Neurone) und für L5 Neurone  $1,30 \pm 0,03$  ( $n = 51$  Neurone). Sie liegt damit deutlich unter dem für adulte Neurone typischen Wert (Howe et al., 1987a). Die durchschnittliche AP-Amplitude der am Soma abgeleiteten Neurone betrug für L2/3 Neurone  $95 \pm 2,3\text{mV}$  ( $n = 59$  Neurone), für L5 Neurone  $91 \pm 2,1\text{mV}$  ( $n = 51$  Neurone), ohne einen statistisch signifikanten Unterschied aufzuweisen. Alle untersuchten Neurone zeigten das typische Entladungsverhalten von so genannten RS-Neuronen (siehe Kapitel 1.1.3.2.2). Sie antworteten auf lang anhaltende, überschwellige Strompulse mit einer Serie von APs, die schnell akkomodierten (Connors und Gutnick, 1990).

A



B



**Abbildung 3.1**

Strom-Spannungsbeziehungen kortikaler Pyramidenneurone der Lamina 2/3 und 5.

**A** Auslenkung des Membranpotentials ( $V_m$ ) bei Injektion von hyper- und depolarisierenden Strompulsen.

**B** Auftragung der Potentialauslenkung gegen den injizierten Strom.

Der Eingangswiderstand  $R_N$  für das L2/3 Neuron beträgt  $279M\Omega$ , für das L5 Neuron  $146M\Omega$ .

## 3.2 Synaptische Verschaltungen von Neuronen des Barrel-Kortex

Ein detailliertes Bild der Organisation neuronaler Netzwerke ist die Voraussetzung, um deren Funktionalität verstehen zu können. Die IR-gelenkte Laserstimulation in Kombination mit der „Patch-Clamp“-Technik bietet eine neue Möglichkeit synaptische Verschaltungen im Hirnschnitt zu kartieren. Besteht zwischen dem abgeleiteten und dem phototaktivierten Neuron eine synaptische Verbindung, kann an der abgeleiteten Zelle ein postsynaptisches Potential registriert werden. Dadurch lassen sich funktionelle synaptische Verbindungen zwischen Neuronen und deren Transmissionsstärke darstellen.

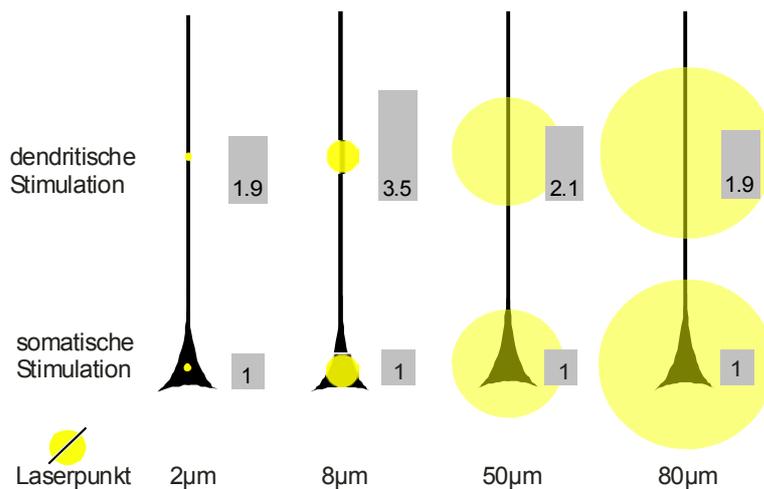
### 3.2.1 Somaspezifität der IR-gelenkten Photostimulation

Die IR-gelenkte Photostimulation stellt eine räumlich hochauflösende Methode dar, die es ermöglicht, neuronale Strukturen wie Somata oder Dendriten unter visueller Kontrolle zu stimulieren. Gleichzeitig bietet sie den Vorteil, dass große Bereiche des Hirnschnittes effektiv nach präsynaptischen Neuronen abgesucht werden können. Für diese topographische Kartierung ist es essentiell, spezifisch neuronale Somata und nicht deren Dendriten zu stimulieren. Neben der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen visuellen Kontrolle der Photostimulation, wurden verschiedene Methoden (z.B. geringe Konzentrationen des AMPA/Kainat-Rezeptor-Antagonisten 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo-(F)-quinoxaline (NBQX)) erprobt, um eine Verbesserung der Somaspezifität zu erzielen. Der Parameter, dessen Optimierung sich als äußerst effektiv erwiesen hat, war der Durchmesser der Quarzfaser, mit der das Laserlicht in das Mikroskop eingekoppelt wurde, und die daraus resultierende Größe des Laserpunktes.

#### 3.2.1.1 Der Durchmesser des Laserpunktes

Getestet wurden Fasern mit Durchmessern ( $d$ ) von 25, 100, 600, 1000 $\mu\text{m}$ , die entsprechende Lichtpunkte mit Durchmessern von 2, 8, 50, 80 $\mu\text{m}$  in der Fokusebene ergaben. Zu diesem Zweck wurden mit allen vier Fasertypen die AP-Schwellen desselben Neurons am Soma sowie am apikalen Dendriten in 60, 90, 120 und 150 $\mu\text{m}$  Entfernung zum Soma gemessen. Dazu wurde das Neuron am Soma abgeleitet und die Laserintensität so weit gesteigert bis durch die Photostimulation genau 1 AP generiert wurde. Je somaspezifischer die Photostimulation war, desto mehr Laserenergie war nötig, um die AP-Schwelle am Dendriten im Vergleich zum Soma zu erreichen. Deshalb wurden die dendritischen AP-Schwellen auf die somatische AP-Schwelle normiert. Unterschiede der AP-Schwelle bei unterschiedlichen Laserpunktgrößen waren am proximalen Dendriten (30, 60, 90 $\mu\text{m}$ ) nur gering ausgeprägt. Je weiter der dendritische Stimulationspunkt jedoch vom Soma entfernt war, desto klarer zeigte sich, dass die höchste Somaspezifität mit Laserpunkten von  $d = 8\mu\text{m}$  erzielt wurde. Hierbei musste der Dendrit mit einer im Vergleich zum Soma 3,5-fachen Intensität beleuchtet werden ( $352 \pm 9\%$ , Anova  $p < 0,05$ ), um 150 $\mu\text{m}$  vom Soma entfernt ein AP auszulösen. Wurden Laserpunkte mit  $d = 50\mu\text{m}$  verwendet, war dagegen nur eine 2,1-fache ( $211 \pm 20\%$ ) und bei 2 $\mu\text{m}$ - und 80 $\mu\text{m}$ -Laserpunkten sogar nur eine 1,9-fache ( $185 \pm 7\%$  und  $192 \pm 17\%$ ) Intensität nötig (Abbildung 3.2 A, B).

A

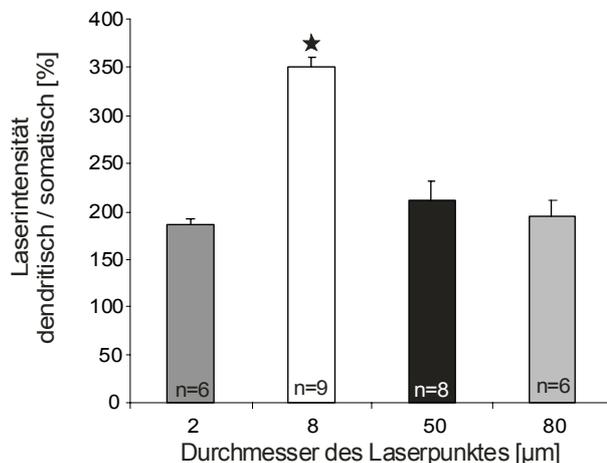
**Abbildung 3.2**

**A** Der Einfluss des Laserpunktdurchmessers auf die Somaspezifität der Photostimulation. Schematische Darstellung

der Laserintensität, die nötig ist, um am Dendriten in 150 µm Entfernung vom Soma ein AP auszulösen (überschwellige Laserintensität) normiert auf die Laserintensität, die nötig ist, um am Soma ein AP auszulösen. Laserpunkte mit einem Durchmesser von 2, 8, 50 und 80 µm wurden verglichen.

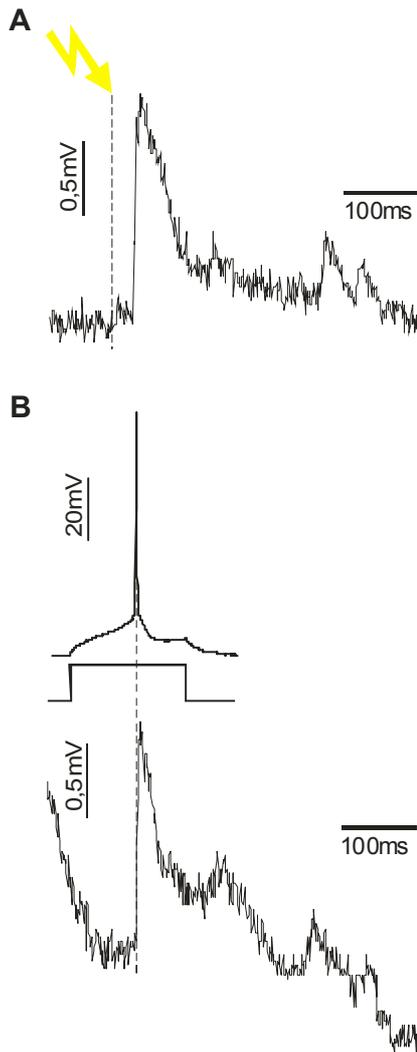
**B** Statistische Auswertung der einzelnen Experimente.

B



### 3.2.1.2 Bestätigung der Somaspezifität durch die simultane Ableitung von zwei Neuronen

Um die Somaspezifität der nach Kapitel 3.2.1 optimierten Laserstimulation zu bestätigen, wurde sowohl das prä- als auch das postsynaptische Neuron simultan abgeleitet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der Doppelableitung angewandt, um exemplarisch die Somaspezifität der Photostimulation an einem Neuronenpaar zu verifizieren. Nachdem die Ableitung des postsynaptischen Neurons stabil war, wurde mittels Photostimulation der Hirnschnitt nach einem mutmaßlich präsynaptischen Neuron durchsucht, das anschließend ebenfalls abgeleitet wurde (Abbildung 3.3). Um die synaptische Verbindung zwischen diesen beiden Neuronen nachzuweisen, wurde in das präsynaptische Neuron ein depolarisierender Strom von 0,8 nA injiziert. Dieser Strom evozierte ein präsynaptisches AP und ein postsynaptisches, exzitatorisches Potential (EPSP). Bei beiden Zellen handelte es sich um Lamina 5 Pyramidenneurone mit einem lateralen Abstand von 161 µm. Eine bidirektionale Konnektivität konnte nicht nachgewiesen werden. Die Latenzzeit des photolytisch ausgelösten EPSPs war mit 35 ms deutlich länger, als die eines durch Strominjektion hervorgerufenen EPSPs (2,2 ms).



**Abbildung 3.3** Doppelableitung  
Simultane Ableitung eines prä- (RMP -59mV) und postsynaptischen Neurons (RMP -63mV).

**A** Photostimulation der präsynaptischen Zelle evozierte ein EPSP im postsynaptischen Neuron mit einer Amplitude von 1,6mV und einer Latenzzeit von 35ms.

**B** Durch Injektion eines depolarisierenden Stroms (0,8nA) wurde in der präsynaptischen Zelle ein AP und in der postsynaptischen Zelle ein EPSP generiert (Amplitude 1,65mV; Latenzzeit 2,2ms).

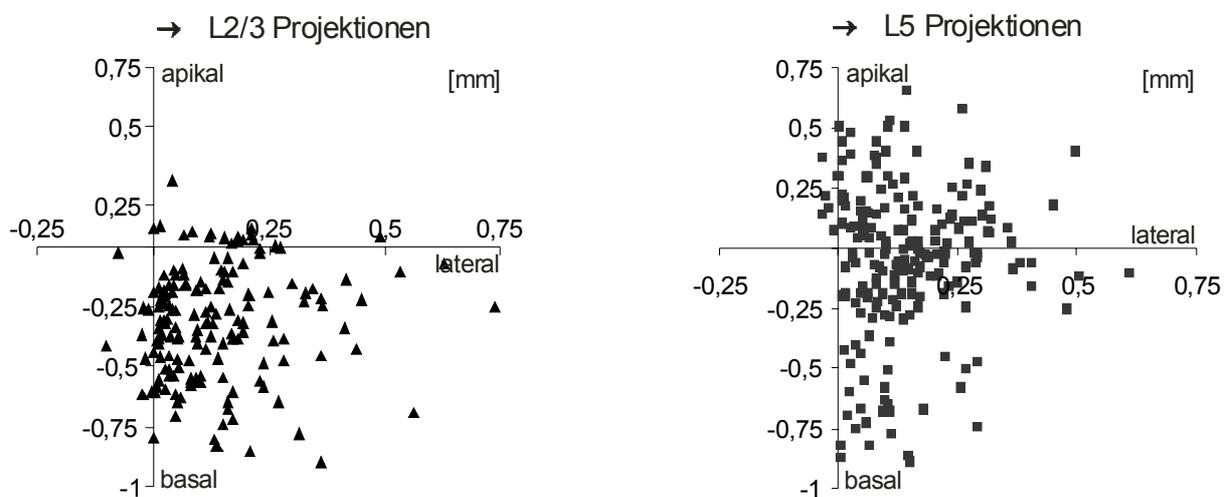
### 3.2.2 Topographische Kartierung von neuronalen Verbindungen auf Einzelzell-Ebene

Grundlegend für das Verständnis neuronaler Netzwerke ist die Kenntnis der synaptischen Verschaltungen von Neuronen. Zu diesem Zweck wurden die Lage postsynaptischer Pyramidenneurone sowie deren präsynaptische Neurone in Relation zu den morphologischen Strukturen des Barrel-Kortex analysiert. Zur Kartierung dieser synaptisch gekoppelten Neurone wurden „Patch-Clamp“-Ableitungen mit IR-gelenkter Photostimulation kombiniert.

Um die Lokalisation der postsynaptischen Zellen zu standardisieren, wurden nur Neurone abgeleitet, die über oder unter einer Lamina 4 Barrelseite lagen. Präsynaptische Zellen wurden mittels photolytischem Glutamat-„uncaging“ in Kortexarealen untersucht, deren Lamina 4 Barrels sich klar differenzieren ließen.

Die Latenzzeit eines durch Photostimulation von präsynaptischen Zellen ausgelösten postsynaptischen Potentials beträgt 20 bis 80ms. Diese lange Latenzzeit ist wiederum durch die lange Latenzzeit des photolytisch evozierten, präsynaptischen APs zu erklären. Dadurch kann ein postsynaptisches Potential klar von einem direkt am abgeleiteten Neuron evozierten Potential unterschieden werden, das keine messbare Latenzzeit aufweist.

Eine reine Darstellung der x- (lateral) und y-Koordinaten (apikal/basal) lieferte lediglich die Information, dass die Wahrscheinlichkeit einer synaptischen Verbindung mit zunehmender Entfernung vom Ableitort abnimmt (Abbildung 3.4). Der Hirnschnitt stellt ein annähernd zweidimensionales Präparat des dreidimensionalen Kortex dar. Die Wahrscheinlichkeit, synaptische Verbindungen durch die Präparation zu durchtrennen, steigt deshalb mit der Entfernung zwischen zwei Neuronen an. Daher sind die maximalen lateralen Entfernungen (L2/3: 740  $\mu\text{m}$ , L5: 610  $\mu\text{m}$ ) sowie die Anzahl der präsynaptischen Neurone pro abgeleitete Zelle (L2/3:  $2,2 \pm 0,5$ ; L5:  $3 \pm 0,9$ ) relative, auf diese Art des Schnittpräparats bezogene Angaben, die unter den Werten liegen, die *in vivo* Studien liefern könnten. Physiologisch relevantere Ergebnisse lieferte die topographische Kartierung der Neurone unter Berücksichtigung der strukturellen Untergliederung des Kortex in Laminae und Barrel-Kolumnen, wie sie im Folgenden dargestellt wird.



**Abbildung 3.4**

Darstellung der Position aller präsynaptischen Neurone von L2/3 und L5 Pyramidenzellen in Abhängigkeit von der Entfernung zum Ableitort (x-Achse: laterale Richtung; y-Achse: apikal/basale Richtung).

### 3.2.2.1 Räumliche Verteilung präsynaptischer Zellen von Lamina 2/3 Pyramidenneuronen im Barrel-Kortex

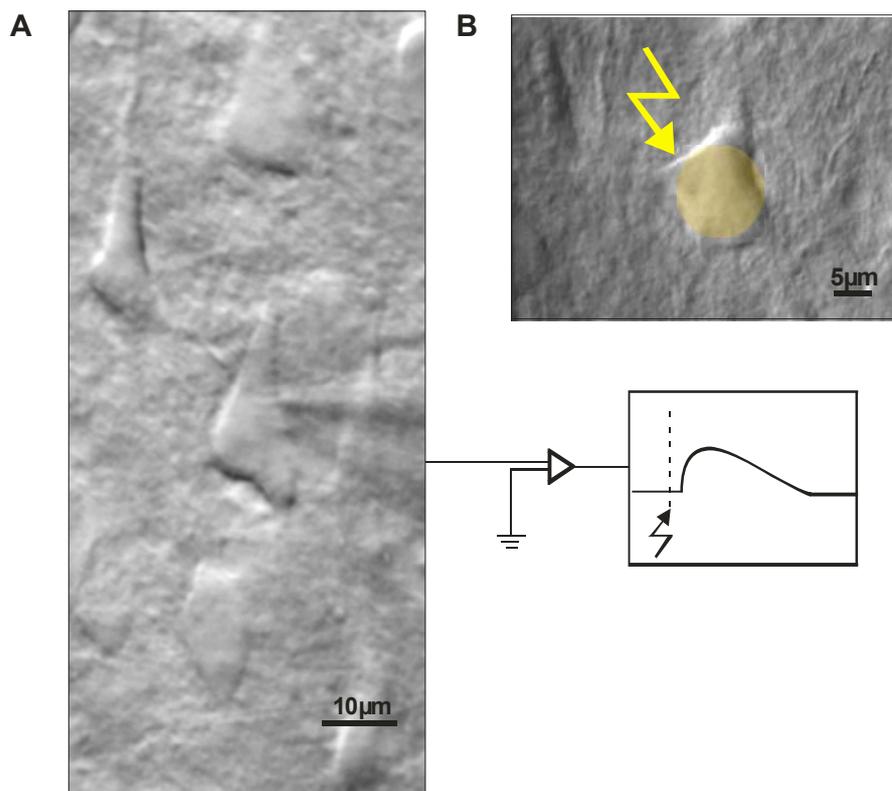
Im folgenden Kapitel wird das Verteilungsmuster exzitatorischer, präsynaptischer Zellen, die auf L2/3 Pyramidenneuronen projizieren, dargestellt (Abbildung 3.5). Zu diesem Zweck wurden die synaptischen Eingänge von 78 L2/3 Neuronen von sensorisch undeprivierten Tieren untersucht. Die topographische Lage von insgesamt 143 visualisierten, präsynaptischen Neuronen wurde durch photolytische Freisetzung von Glutamat bestimmt, während simultan von L2/3 Pyramidenneuronen abgeleitet wurde.

Der größte Teil der präsynaptischen Neurone, die auf L2/3 Pyramidenzellen projizieren, war in der ersten Barrel-Kolumne, die an den Ableitort angrenzt, lokalisiert (81%). Nur ein kleiner Anteil von 19% aller → L2/3 Projektionen hatte ihren Ursprung in der zweiten (13%) und dritten Barrel-Kolumne (6%). Dieser Befund trifft auf alle Laminae zu. Präsynaptische Neurone, die auf L2/3 Pyramidenneuronen verschalten, wurden in L2/3, in L4 und L5, jedoch nicht in L1 und L6 gefunden.

Die häufigsten Projektionen auf L2/3 Neuronen waren intralaminär (L2/3 → L2/3 Projektionen, 40%) (Abbildung 3.11, 3.12, 3.13). Der größte Teil dieser L2/3 → L2/3 Projektionen (85%) war intrakolumnär und verlief innerhalb der ersten L2/3 Kolumne. Nur 15% waren dagegen interkolumnär, wobei 10% aus der zweiten und 5% aus der dritten Barrel-Kolumne stammten. Dadurch wies die Anzahl der L2/3 → L2/3 Projektionen innerhalb der ersten L2/3 Kolumne einen signifikant höheren Wert auf als die Projektionen von der zweiten L2/3 Kolumne (Cochran Test,  $Q(1)=20,57$  mit einer Signifikanz von  $Q<0,0001$ ).

Fast ebenso häufig wie die intralaminären Projektionen von L2/3 waren die L4 → L2/3 Projektionen (37%). Dabei hatten die meisten dieser interlaminären Projektionen ihren Ursprung im angrenzenden Barrel (86% der L4 → L2/3 Projektionen). Nur wenige L4 → L2/3 Projektionen hatten ihren Ursprung im zweiten Barrel (12%) und sehr wenige im dritten Barrel (2%) (Abbildung 3.11, 3.12, 3.13). Daher zeigte die Häufigkeit der L4 → L2/3 Projektionen für das erste Barrel einen signifikant höheren Wert als für das zweite Barrel (Cochran Test,  $Q(1)=8,90$  mit einer Signifikanz von  $Q=0,003$ ).

L5 → L2/3 Projektionen waren vergleichsweise selten zu finden (23%). Sie zeigten jedoch ebenso eine gehäuftes Vorkommen innerhalb der ersten Barrel-Kolumne (64% der L5 → L2/3 Projektionen), das jedoch nicht so stark ausgeprägt war wie in L2/3 oder L4 (Abbildung 3.11, 3.12, 3.13). 22% der L5 → L2/3 Projektionen stammten aus der zweiten und 14% aus der dritten L5 Barrel-Kolumne. Die Häufigkeit der L5 → L2/3 Projektionen der ersten und zweiten L5 Kolumne waren somit signifikant unterschiedlich (Cochran Test,  $Q(1)=5,4$  mit einer Signifikanz von  $Q=0,02$ ). Über die Grenzen der dritten Barrel-Kolumne hinaus konnten von keiner Lamina synaptische Verbindung nachgewiesen werden.



### Abbildung 3.5

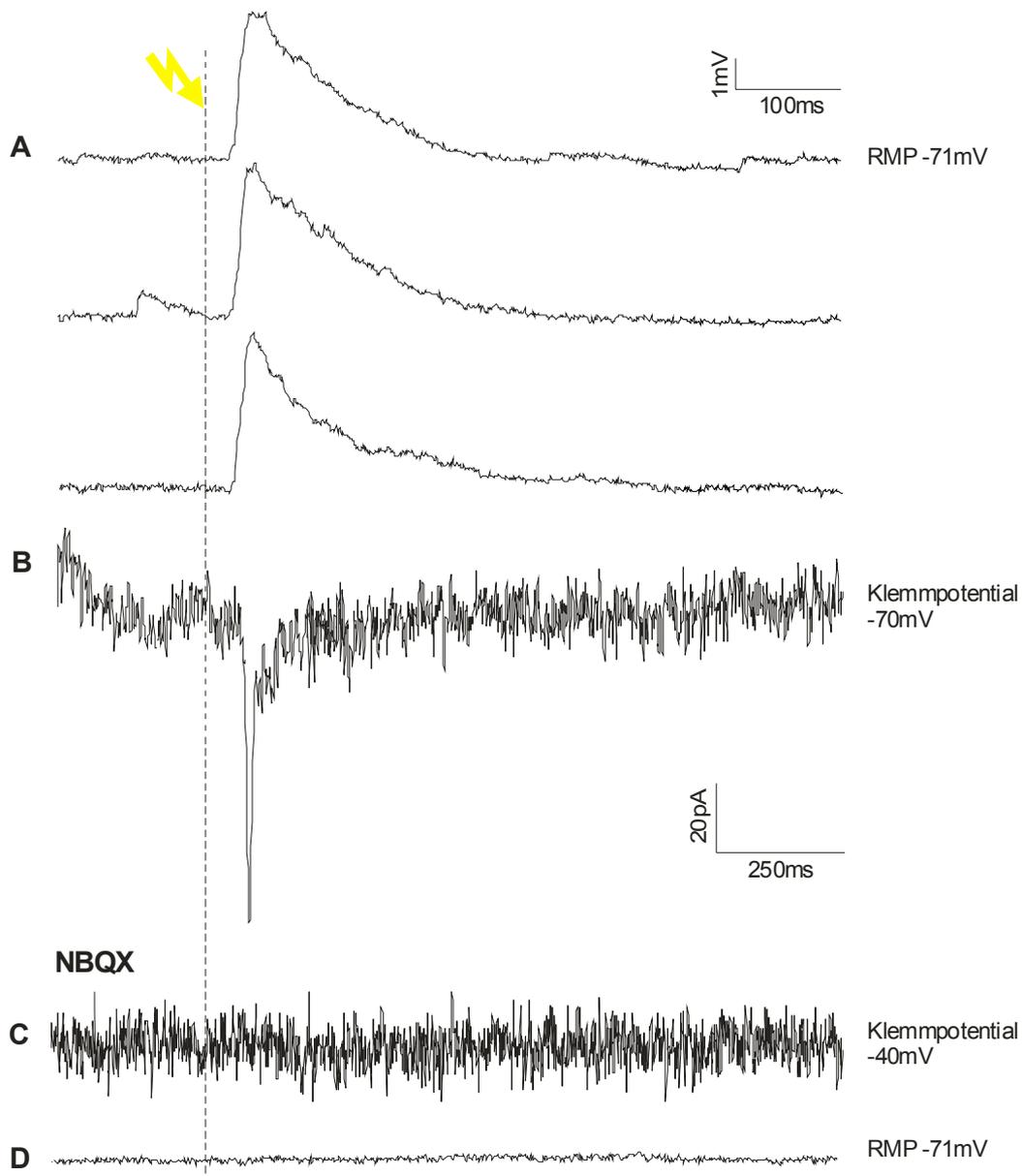
IR-Aufnahmen von Pyramidenneuronen der Lamina 2/3

**A** postsynaptisches, abgeleitetes Neuron

**B** präsynaptisches, photostimuliertes Neuron

**Pharmakologische Charakterisierung der EPSPs**

Die mittlere Amplitude der von L2/3 Pyramidenneuronen abgeleiteten EPSPs liegt bei 3,1mV (Median 2,8; Minimum 0,3mV; Maximum 9,3mV). Eine Korrelation der EPSP-Amplitude mit der räumlichen Lokalisation des präsynaptischen Neurons konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.6**

Durch Photostimulation evozierte EPSPs (A) bzw. EPSC (B) eines L2/3 Pyramidenneurons. Durch Applikation von NBQX (0,8 $\mu$ M) konnte das EPSC (C) bzw. EPSP (D) völlig blockiert werden.

Die pharmakologische Charakterisierung der EPSPs war schwierig, da die über die ACSF applizierten Rezeptor-Antagonisten sowohl am abgeleiteten, postsynaptischen Neuron, wie auch am stimulierten, präsynaptischen Neuron wirken. Deshalb wurde bei diesen Versuchen mit einer höheren Konzentration caged Glutamat gearbeitet (1mM statt 0,25mM). Nach Zugabe der kompetitiven Glutamat-Antagonisten wurde die Laserintensität soweit erhöht (ca. 3-fach) bis mittels der Photostimulation am abgeleiteten Neuron wieder ein Aktionspotential ausgelöst wurde. Durch Applikation des nicht-NMDA-Rezeptor-Antagonisten NBQX (0,8 $\mu$ M; n=8) konnten die EPSPs von allen Neuronen sowohl am RMP als auch bei -40mV völlig blockiert werden (Abbildung 3.6). Die Applikation des NMDA-Rezeptor-Antagonisten D(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure (D-APV) (50 $\mu$ M; n=4) zeigte keinen Effekt auf die EPSPs. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die abgeleiteten EPSPs hauptsächlich durch AMPA-Rezeptoren vermittelt werden.

### 3.2.2.2 Räumliche Verteilung präsynaptischer Zellen von Lamina 5 Pyramidenneuronen im Barrel-Kortex

Im folgenden Kapitel wird das Verteilungsmuster exzitatorischer, präsynaptischer Zellen, die auf Lamina 5 Pyramidenneuronen projizieren, dargestellt (Abbildung 3.7). Zu diesem Zweck wurden die synaptischen Eingänge von 48 L5 Neuronen von sensorisch undepriviert Tieren untersucht. Die topographische Lage von insgesamt 143 visualisierten, präsynaptischen Neuronen wurde durch photolytische Freisetzung von Glutamat bestimmt, während simultan von L5 Pyramidenneuronen abgeleitet wurde.

Die meisten Neurone, die auf L5 Pyramidenneuronen projizieren, waren in L5 selbst lokalisiert (L5  $\rightarrow$  L5 Projektionen, 70%) (Abbildung 3.14, 3.16, 3.17) und bilden daher lokal sehr begrenzte, intrakortikale Verschaltungen. 86% der L5  $\rightarrow$  L5 Projektionen blieben auf die erste, angrenzende L5 Barrel-Kolumne beschränkt. Die Häufigkeit der L5  $\rightarrow$  L5 Projektionen nahm linear ab mit zunehmendem Abstand zwischen dem stimulierten und dem abgeleiteten Neuron (univariater F-Test,  $p < 0.05$ ). Da vereinzelt präsynaptische Neurone (1%) in der dritten L5 Kolumne nachgewiesen werden konnten, stellen L5  $\rightarrow$  L5 Projektionen die Verbindungen mit der größten lateralen Reichweite dar.

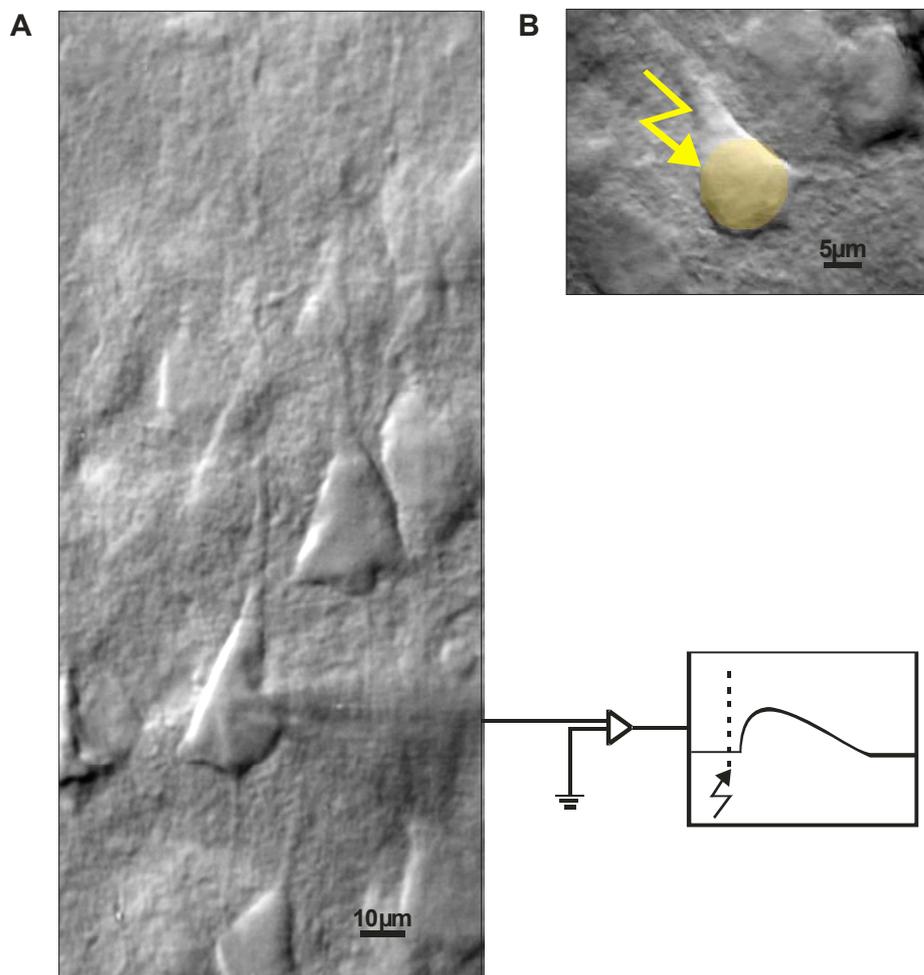
Die zweithäufigsten Projektionen auf L5 Neuronen stammten aus L2/3 (L2/3  $\rightarrow$  L5 Projektionen, 15%). Diese interlaminären Verbindungen zeigten ein statistisch signifikantes periodisches Muster (Cochran Tests,  $< 0,05$ ). L2/3  $\rightarrow$  L5 Projektionen waren um ein Vielfaches häufiger in Bereichen lokalisiert, die über den Barrel-Seiten lagen (Kolumnen-Wände), und nur sehr selten in Bereichen, die über den Barrel-Höhlen lagen (Kolumnen-Zentren) (Abbildung 3.14, 3.16, 3.17). Um auszuschließen, dass dem gehäuftem Auftreten präsynaptischer Neurone der L2/3  $\rightarrow$  L5 Projektionen in den Kolumnenwänden eine unterschiedliche Verteilung der Neurone zugrunde liegt, wurde die Neuronendichte von L2/3 in Bereichen oberhalb der Barrelseiten und der Barrelhöhlen in einer Fokusebene gemessen. Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Kolumnen-Wände  $2,7 \pm 0,2$  Neurone/100 $\mu$ m<sup>2</sup>; Kolumnen-Zentrum  $2,6 \pm 0,2$  Neurone/100 $\mu$ m<sup>2</sup>). Das periodische Eingangsmuster der L2/3  $\rightarrow$  L5 Projektionen spiegelt somit auf der funktionellen Ebene die Struktur der Barrel-Kolumne innerhalb von L2/3 wider.

L4  $\rightarrow$  L5 Projektionen wurden selten beobachtet (6%). Die wenigen präsynaptische L4 Neurone waren fast ausschließlich in der Seite s2 des benachbarten Barrels lokalisiert

(Abbildung 3.14, 3.16, 3.17), so dass die Wahrscheinlichkeit einer synaptischen L4 → L5 Verbindung für die Seite s2 signifikant am höchsten war (Cochran Test,  $Q(5) = 20,5$  mit einer Signifikanz von  $Q=0,001$ ). L4 → L5 Projektionen von Neuronen der ersten (s1) und dritten (s3) Barreelseite waren weniger häufig zu beobachten. L4 Neurone der Barrel-Höhlen, die durch eine geringe Zelldichte charakterisiert sind, wiesen keine Verbindungen zu L5 Neuronen auf.

Der Anteil der L6 → L5 Projektionen betrug 9% der gesamten → L5 Projektionen. Die präsynaptischen Neurone dieser L6 → L5 Projektionen waren auf die erste, angrenzende Barrel-Kolumne beschränkt. Aus den weiter entfernten Kolumnen stammten keine L6 → L5 Projektionen (Abbildung 3.14, 3.16, 3.17).

L1 → L5 Projektionen konnten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.14). Da es sich bei L1 um eine zellarmen Schicht ohne Pyramidenzellen, jedoch mit Dendriten handelt, bestätigt dieser Befund die Somaspezifität der angewandten Photostimulation.



**Abbildung 3.7**

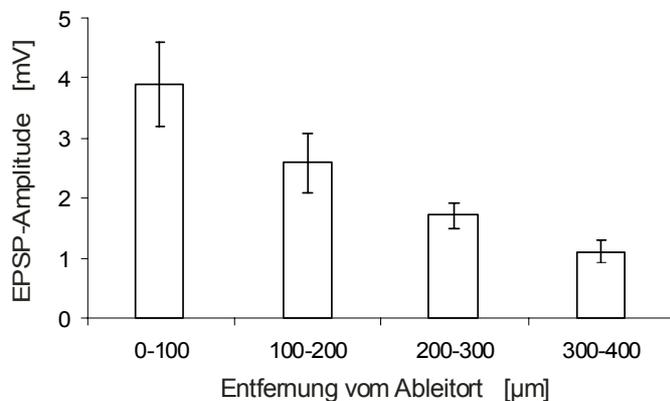
IR-Aufnahmen von Pyramidenneuronen der Lamina 5

**A** postsynaptisches, abgeleitetes Neuron

**B** präsynaptisches, photostimuliertes Neuron

### Pharmakologische Charakterisierung der EPSPs

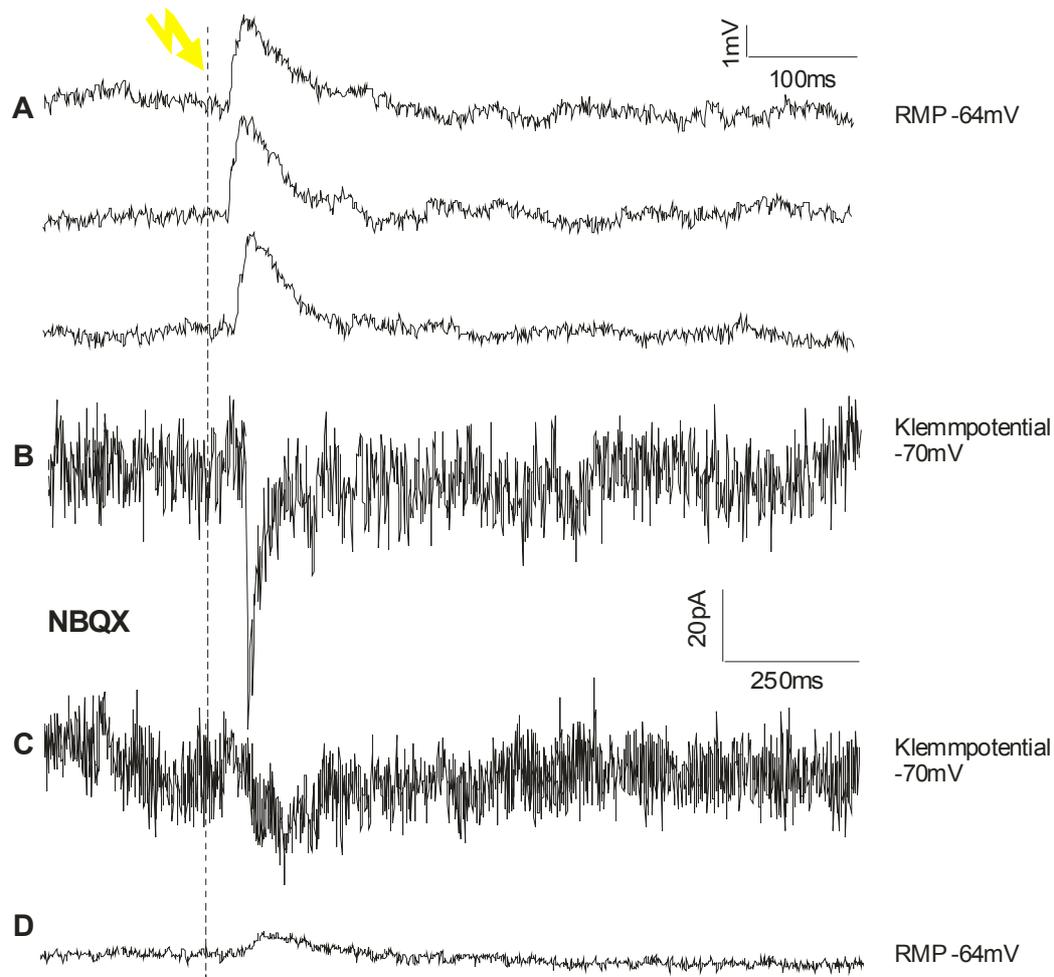
Die mittlere Amplitude der von L5 abgeleiteten EPSPs lag bei 2,9mV (Median 2,6mV; Minimum 0,3mV; Maximum 11,7mV). Es konnte eine Korrelation der EPSP-Amplitude mit der Lokalisation der entsprechenden präsynaptischen Neurone nachgewiesen werden. Die Amplitude nahm mit zunehmender horizontaler Entfernung von Ableitort stetig ab (Abbildung 3.8).



#### Abbildung 3.8

Abhängigkeit der EPSP-Amplitude vom Abstand zwischen dem prä- und postsynaptischen Neuron.

Die Vorgehensweise zur pharmakologischen Charakterisierung der EPSPs wurde in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben. Durch Applikation des nicht-NMDA-Rezeptor-Antagonisten NBQX ( $0,8\mu\text{M}$ ;  $n = 12$ ) konnten die EPSP von 8 Neuronen völlig blockiert werden. Die EPSPs von 4 Neuronen zeigten einen durch NBQX nicht blockierbaren Anteil von  $8 \pm 2\%$  (gemessen am RMP) mit einer langsamen Kinetik (Abbildung 3.9). Die Applikation des NMDA-Rezeptor-Antagonisten D-APV ( $50\mu\text{M}$ ) reduzierte bei 2 von 7 abgeleiteten Neuronen das EPSP um 1%. In den restlichen 5 Fällen änderte sich die Amplitude des EPSPs nach Zugabe von D-APV nicht. Daraus kann geschlossen werden, dass NMDA-Rezeptoren unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nur zu einem sehr geringen Teil an der synaptischen Übertragung beteiligt sind.

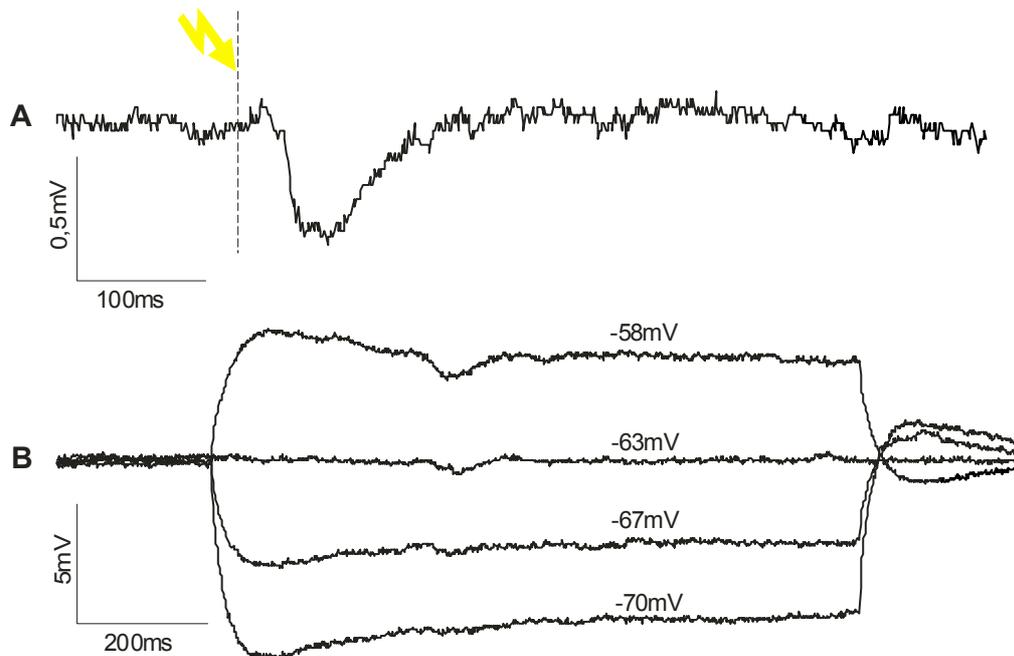


**Abbildung 3.9**

Durch Photostimulation evozierte EPSPs (A) bzw. EPSC (B) eines L5 Pyramidenneurons. Durch Applikation von NBQX (0,8 $\mu$ M) wurde das EPSC bzw. EPSP auf 14% (C) bzw. auf 12% (D) reduziert.

### 3.2.3 Die räumliche Verteilung präsynaptischer, inhibitorischer Neurone im Barrel-Kortex

Inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) wurden durch IR-gelenkte Photostimulation im Vergleich zu EPSPs nur selten ausgelöst. Von den insgesamt 158 stimulierten, präsynaptischen Neuronen, die zu L5 projizierten, evozierten nur 15 IPSPs. 13 dieser Neurone waren in L5, zwei in L2/3 lokalisiert (Abbildung 3.10). Alle 15 auf L5 projizierenden, inhibitorischen Neurone lagen in der ersten Barrel-Kolumne. Ihre mittlere Amplitude betrug  $0,4 \pm 0,4\text{mV}$ . Inhibitorische Neurone, die auf L2/3 projizieren konnten nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.10**

**A** IPSP, das von einem L5 Pyramidenneuron abgeleitet (RMP -63mV) und durch Photostimulation eines L2/3 Interneurons evoziert wurde.

**B** Depolarisierende Strompulse erhöhen die Amplitude des IPSPs. Hyperpolarisierende Strompulse dagegen reduzieren die Amplitude, so dass sie bei -70mV null beträgt. Das Umkehrpotential des IPSPs liegt somit bei -70mV.

### 3.2.4 Auswirkungen sensorischer Deprivation auf die synaptischen Verschaltungen von Neuronen im Barrel-Kortex

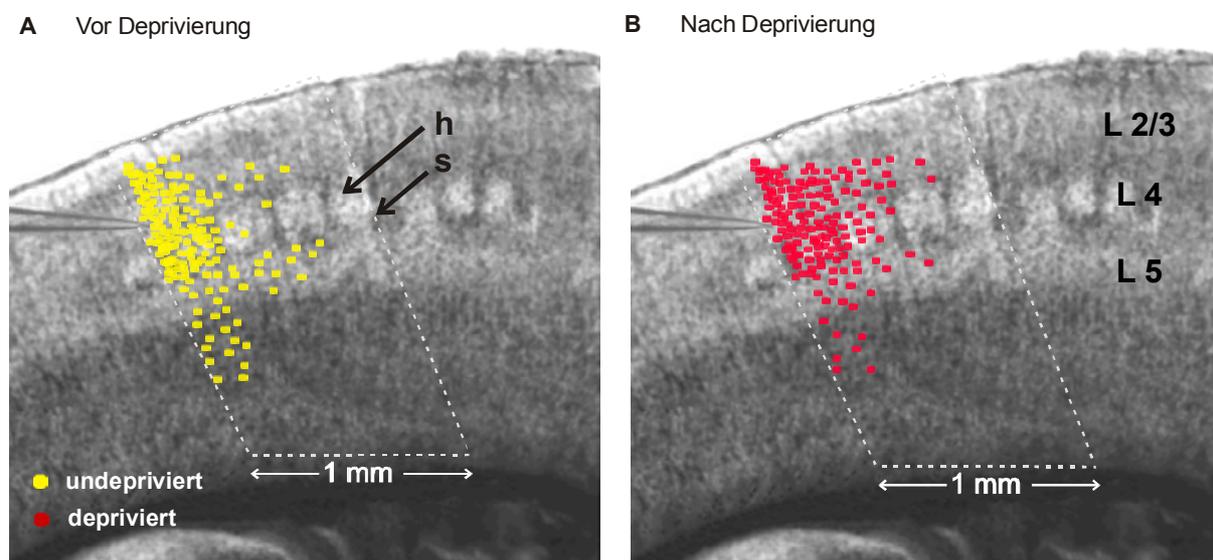
In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob sensorische Information ein entscheidender Faktor für die Entwicklung neuronaler Schaltkreise des Barrel-Kortex ist. Zu diesem Zweck wurde geprüft, ob sensorische Deprivation (siehe Kapitel 2.1) während der Ausbildung synaptischer Verschaltungen das Muster intrakortikaler exzitatorischer Einzelzell-Verbindungen verändert.

Synaptische Verbindungen konnten mittels IR-gelenkter Photostimulation erst ab dem postnatalen Tag (PND) 11 nachgewiesen werden (n=7). Dieser Befund wie auch verschiedene Literaturstellen (Klintsova AY und Greenough, 1999; Zito und Svoboda, 2002) belegen, dass die intrakortikalen Synapsen am Ende der zweiten postnatalen

Woche ausgebildet werden. Um die direkten Auswirkungen der Deprivation auf die intrakortikalen Verschaltungen untersuchen zu können und keine Deprivationseffekte in subkortikalen Strukturen auszulösen, wurden die Vibrissen erst ab PND 9 abgeschnitten.

### 3.2.4.1 Der Einfluss sensorischer Deprivation auf die synaptischen Verschaltungen von L2/3 Neuronen

Um festzustellen, ob sensorische Deprivation die räumliche Verteilung der präsynaptischen Neurone von L2/3 Pyramidenneuronen verändert, wurden die synaptischen Eingänge von 63 L2/3 Neuronen in Hirnschnitten sensorisch deprivierter Tiere untersucht. Die topographische Lage von 148 präsynaptischen Neuronen wurde durch die Kartierung von Glutamat-induzierter Aktivität identifiziert.

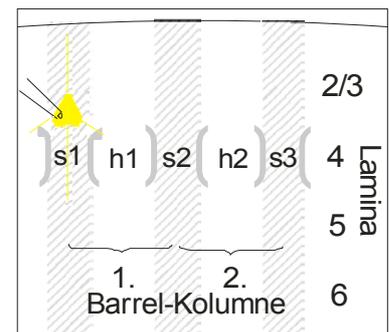
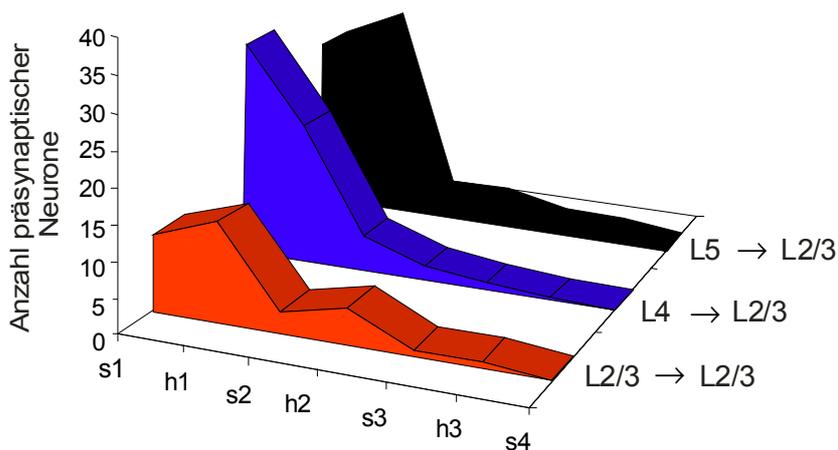
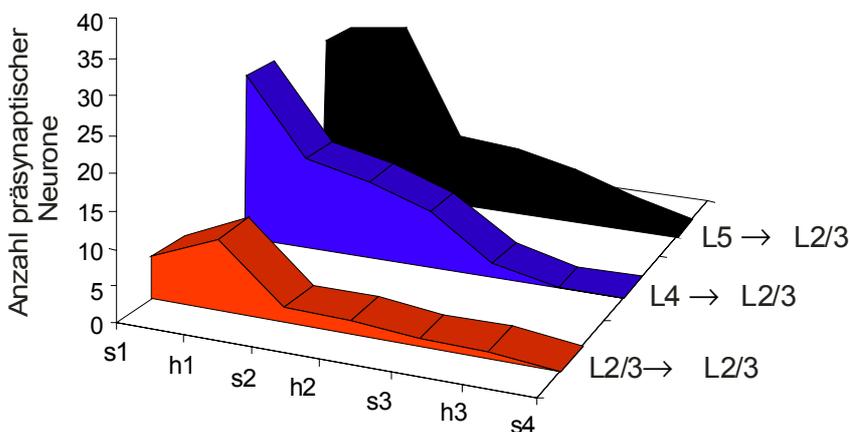


**Abbildung 3.11**

Im thalamokortikalen Hirnschnitt des Barrel-Kortex ist die Lage der präsynaptischen Zellen aller Experimente, die auf L2/3 Pyramidenneuronen projizieren, vor (A, gelb) und nach (B, rot) Deprivation durch Farbpunkte markiert. Der stimulierte Bereiche von 1mm Breite ist gestrichelt umrandet. h Barrelhöhlen, s Barrelseiten

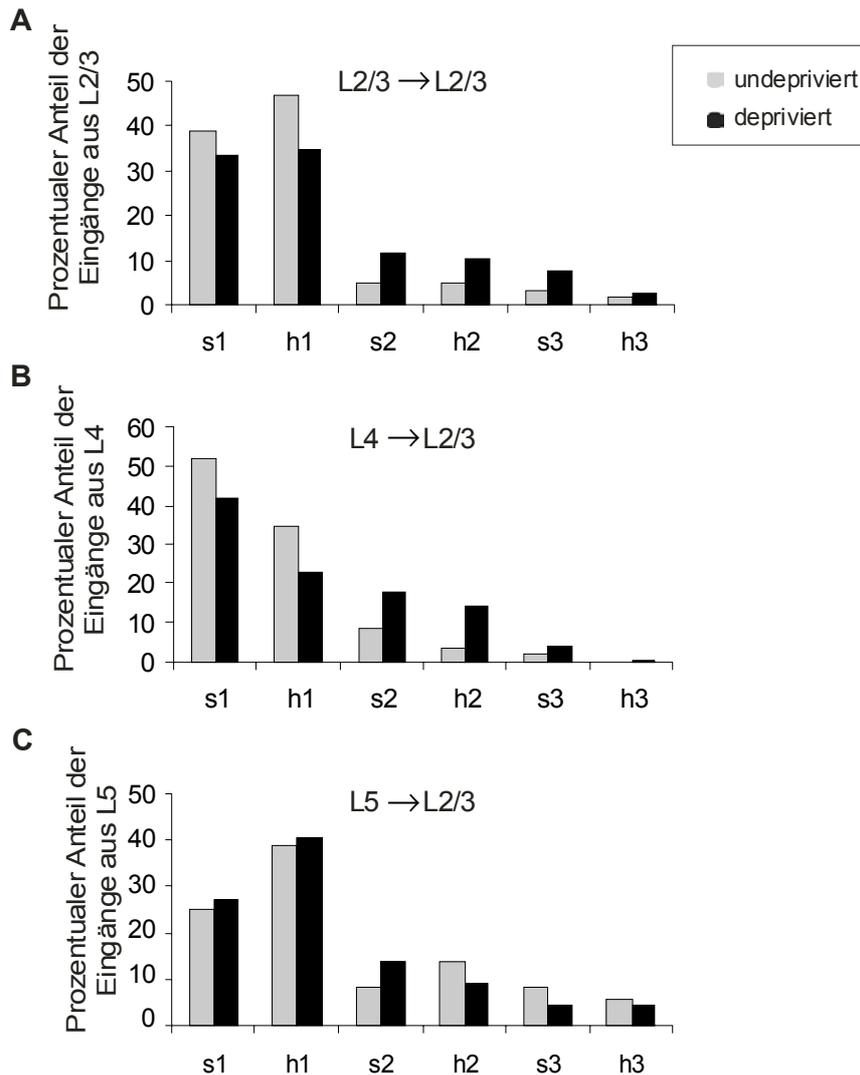
Intralaminäre Projektionen (L2/3 → L2/3 Projektionen) waren vor (40%) als auch nach Deprivation (47%) die häufigste Art der → L2/3 Verbindungen (Abbildung 3.11, 3.12, 3.13). Durch Deprivation wurde der Anteil der L2/3 → L2/3 Projektionen, deren post- und präsynaptisches Neuron innerhalb der ersten L2/3 Kolumne liegt, jedoch von 86% auf 68% reduziert. Stattdessen verdoppelte sich die Anzahl der → L2/3 Projektionen aus der zweiten und dritten L2/3 Barrel-Kolumne (von 15% auf 32%).

Dasselbe Phänomen konnte in L4 beobachtet werden (Abbildung 3.11, 3.12, 3.13). Unbeeinflusst von der Deprivation war ein großer Teil der zu L2/3 projizierenden Neurone in L4 lokalisiert (39%, vor Deprivation 37%). Interkolumnäre L4 → L2/3 Projektionen aus dem zweiten und dritten Barrels wurden jedoch durch Deprivation mehr als verdoppelt (von 14% auf 35%). Im Gegensatz dazu wurden die → L2/3 Projektionen aus dem ersten Barrel von 86% auf 65% reduziert.

**A** Vor Deprivation

**B** Nach Deprivation

**Abbildung 3.12**

Verteilung der präsynaptischer Neurone, die auf L2/3 Pyramidenneuronen projizieren, über die Seiten- bzw. Zentralbereiche der Barrelkolumnen (x-Achse) und die verschiedenen Laminae (z-Achse) vor (A) und nach (B) Deprivation. Die Skizze stellt schematisch die morphologische Organisation des Barrel-Kortex mit Barrel-Seiten (s), -Höhlen (h) und Laminae (L) dar.

Sensorische Deprivation bewirkt somit eine prozentuale Verschiebung der auf L2/3 projizierenden, präsynaptischen Neurone von der ersten zur zweiten Barrel-Kolumne. In Hirnschnitten undeprivierter Tiere waren mehr als 80% aller präsynaptischen Neurone in der ersten, an den Ableitort angrenzenden Barrel-Kolumne lokalisiert. Durch Deprivation wurde dieser Wert auf 67% reduziert. Die Anzahl der auf L2/3 projizierenden Neurone, die in der zweiten Barrel-Kolumne lokalisiert sind, hat sich hingegen nahezu verdoppelt (von 14% auf 26%) (Abbildung 3.11, 3.12, 3.13). Die morphologisch nicht definierbare Grenze zwischen der ersten und zweiten L2/3 Barrelkolumne kann vor Deprivation durch die Beschränkung der  $\rightarrow$  L2/3 Projektionen auf den Bereich innerhalb der ersten Kolumne als eine funktionelle Grenze definiert werden. Nach Deprivation ist diese Grenze verwischt. Einen starken Hinweis hierauf liefert die Beobachtung, dass  $\rightarrow$  L2/3 Verbindungen nach Deprivation häufiger über die Grenzen der Barrel-Kolumne projizieren (33%, vor Deprivation 19%). Diese Umverteilung der präsynaptischen, auf L2/3 projizierenden Neurone manifestiert sich in L4 und L2/3.

**Abbildung 3.13**

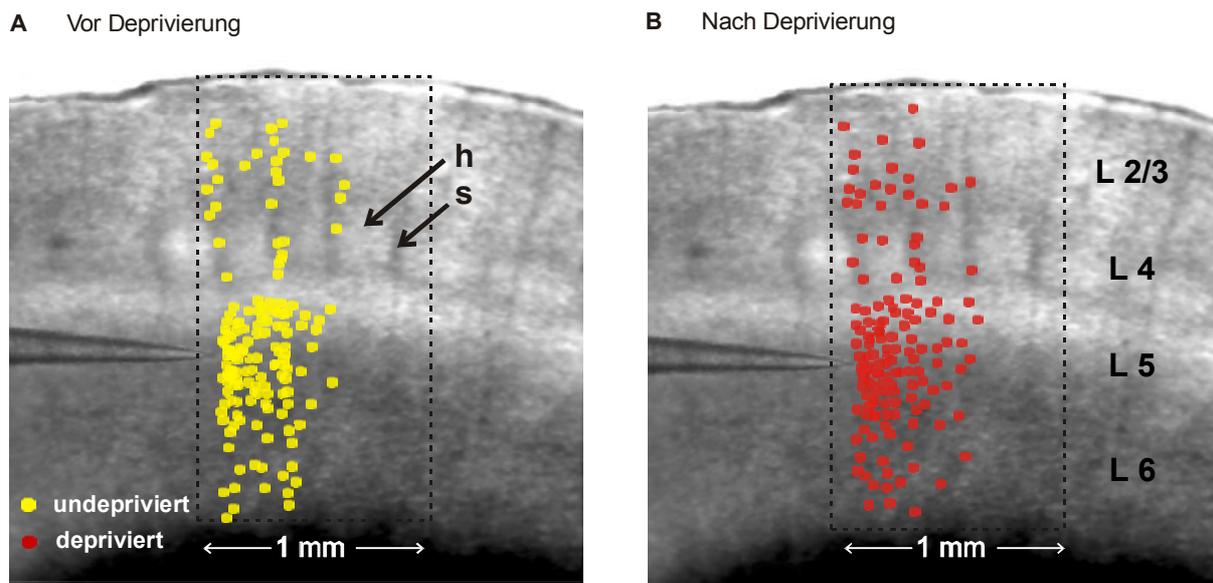
Prozentualer Anteil der auf L2/3 projizierenden Neurone der verschiedenen Laminae normalisiert auf die gesamte Anzahl der Eingänge der entsprechenden Lamina vor (hellgrau) und nach Deprivation (schwarz).

Präsynaptische Neurone der L5 → L2/3 Projektionen wurden im Gegensatz zu Projektionen aus apikalere Laminae nicht in distalere L5 Barrel-Kolumnen umverteilt. Die Häufigkeit der L5 → L2/3 Projektionen wurde durch Deprivation von 23% auf 15% reduziert. Der relative Anteil der L5 → L2/3 Projektionen pro Kolumne änderte sich jedoch nicht (Abbildung 3.11, 3.12, 3.13). Die mittlere Amplitude der in Lamina 2/3 abgeleiteten EPSPs liegt bei 3,3mV (Median 2,1mV; Minimum 0,3mV; Maximum 10,6mV). Die sensorische Deprivation hatte somit keinen signifikanten Effekt auf die EPSP-Amplitude (Abbildung 3.18).

Die pharmakologische Charakterisierung der von L2/3 Neuronen abgeleiteten EPSPs zeigte sich durch die sensorische Deprivation unbeeinflusst. Durch Applikation des nicht-NMDA-Rezeptor-Antagonisten NBQX (0,8μM; n=4) konnten die EPSPs von allen Neuronen sowohl am RMP als auch bei -40mV vor wie auch nach Deprivation völlig blockiert werden. Die Applikation des NMDA-Rezeptor-Antagonisten D-APV (50μM; n=4) zeigte keinen Effekt auf die EPSPs. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die abgeleiteten EPSPs auch nach sensorischer Deprivation hauptsächlich durch AMPA-Rezeptoren vermittelt werden.

### 3.2.4.2 Der Einfluss sensorischer Deprivation auf die synaptischen Verschaltungen von L5 Neuronen

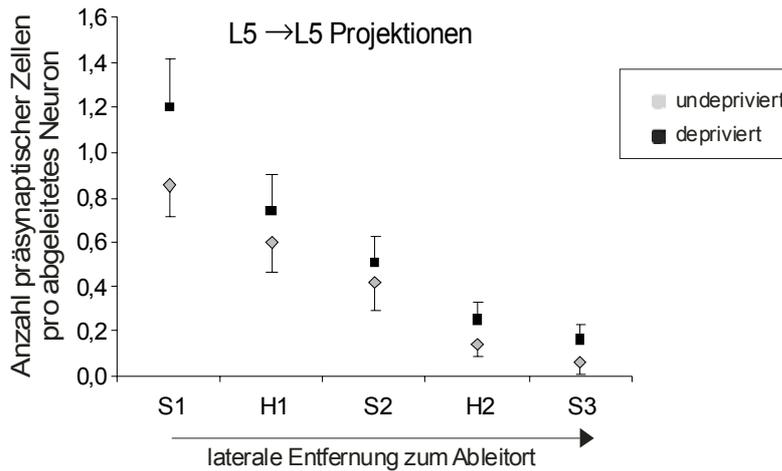
Um festzustellen, ob sensorische Deprivation die räumliche Verteilung der präsynaptischen Neurone von L5 Pyramidenneuronen verändert, wurden die synaptischen Eingänge von 24 L5 Neuronen in Hirnschnitten sensorisch deprivierter Tiere untersucht. Die topographische Lage von 148 präsynaptischen Neuronen wurde durch die Kartierung von Glutamat-induzierter Aktivität in eben solchen Hirnschnitten identifiziert.



**Abbildung 3.14**

Im thalamokortikalen Hirnschnitt des Barrel-Kortex sind die Lage der zu L5 Pyramidenneuronen präsynaptischen Zellen aller Experimente vor (A, gelb) und nach (B, rot) Deprivation durch Farbpunkte markiert. Die stimulierten Bereiche von 1mm Breite sind gestrichelt umrandet. h Barrelhöhlen, s Barrelseiten

Der größte Teil der Neurone, die auf L5 Pyramidenzellen projizieren, war vor (70%) wie auch nach der Deprivation (69%) in L5 lokalisiert (L5 → L5 Projektionen) (Abbildung 3.14, 3.16, 3.17). Die maximalen lateralen Reichweiten der L5 → L5 Projektionen zeigten keine von der sensorischen Deprivation abhängigen Änderungen. Nach Deprivation nahm die Häufigkeit der L5 → L5 Projektionen mit zunehmender Distanz zwischen stimuliertem und abgeleitetem Neuron weiterhin linear ab (univariater F-test,  $p < 0.05$ ). Die negativen Steigungen der Kurven zeigten keine signifikanten Unterschiede (Polynomialer Kontrast-Test,  $p < 0.05$ ). Jedoch die Anzahl der präsynaptischen L5 Neurone pro postsynaptisches L5 Neuron stieg durch die Deprivation signifikant an (Varianzanalyse,  $F(1,18) = 4.44$ , Signifikanz von  $F < 0.038$ ) (Abbildung 3.15). Dieser Befund gilt sowohl für präsynaptische Neurone der L5 Kolumnen-Wände als auch für die Kolumnen-Zentren. So wurde durch sensorische Deprivation die Häufigkeit und nicht das Muster der synaptischen Verbindungen innerhalb von L5 verändert.



Anzahl präsynaptischer L5 Neurone pro abgeleitetes L5 Neuron			
	undepriviert	depriviert	Zunahme [%]
<b>S1</b>	0.85	1.20	41
<b>H1</b>	0.60	0.74	23
<b>S2</b>	0.42	0.51	21
<b>H2</b>	0.15	0.26	73
<b>S3</b>	0.06	0.17	183

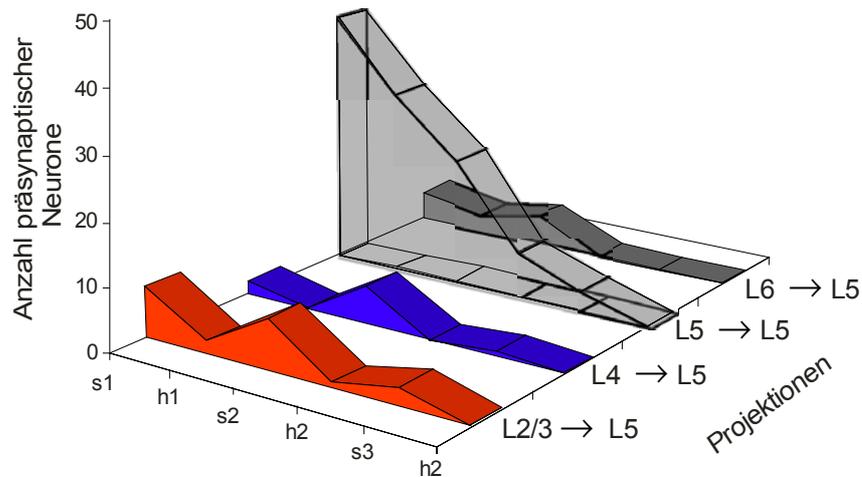
**Abbildung 3.15**

Abhängigkeit der Anzahl präsynaptischer Zellen pro abgeleitetes L5 Pyramidenneuron von der Entfernung zwischen prä- und postsynaptischem Neuron vor (hellgrau) und nach Deprivation (schwarz).

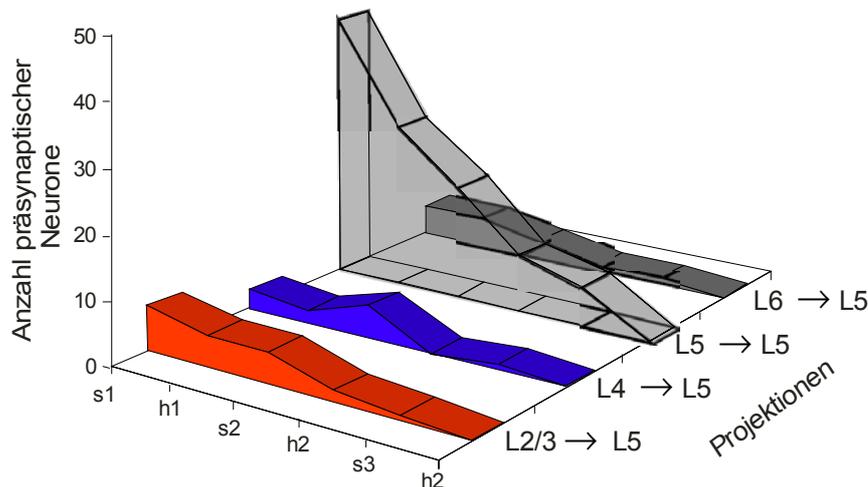
Kasten: Tabellarische Auflistung der Werte mit der prozentualen Zunahme durch Deprivation.

Die zweithäufigste Art der L5 Verbindungen waren vor (15%) wie auch nach der Deprivation (14%) L2/3 → L5 Projektionen. In Hirnschnitten undeprivierter Tiere zeigten diese interlaminären Verbindungen ein periodisches Muster, das dadurch zustande kam, dass L2/3 → L5 Projektionen häufiger aus Wandbereichen der Kolumnen stammten und nur sehr selten aus deren zentralen Bereichen. Das heißt zentrale Bereiche der L2/3 Kolumne wiesen mehr präsynaptische Neurone auf, Wandbereiche hingegen weniger. Im Gegensatz dazu konnte ein solch periodisches Muster der synaptischen Eingänge in Hirnschnitten deprivierter Tiere nicht mehr beobachtet werden (Cochran Tests, <0.05). Stattdessen nahm die Häufigkeit der L2/3 → L5 Projektionen linear mit zunehmender lateraler Distanz zwischen stimuliertem und abgeleitetem Neuron ab (Abbildung 3.18). Somit war im Barrel-Kortex deprivierter Tieren die funktionelle Abgrenzung der kortikalen Kolumne anhand der L2/3 → L5 Projektionen nicht mehr nachzuweisen.

## A Vor Deprivierung



## B Nach Deprivierung

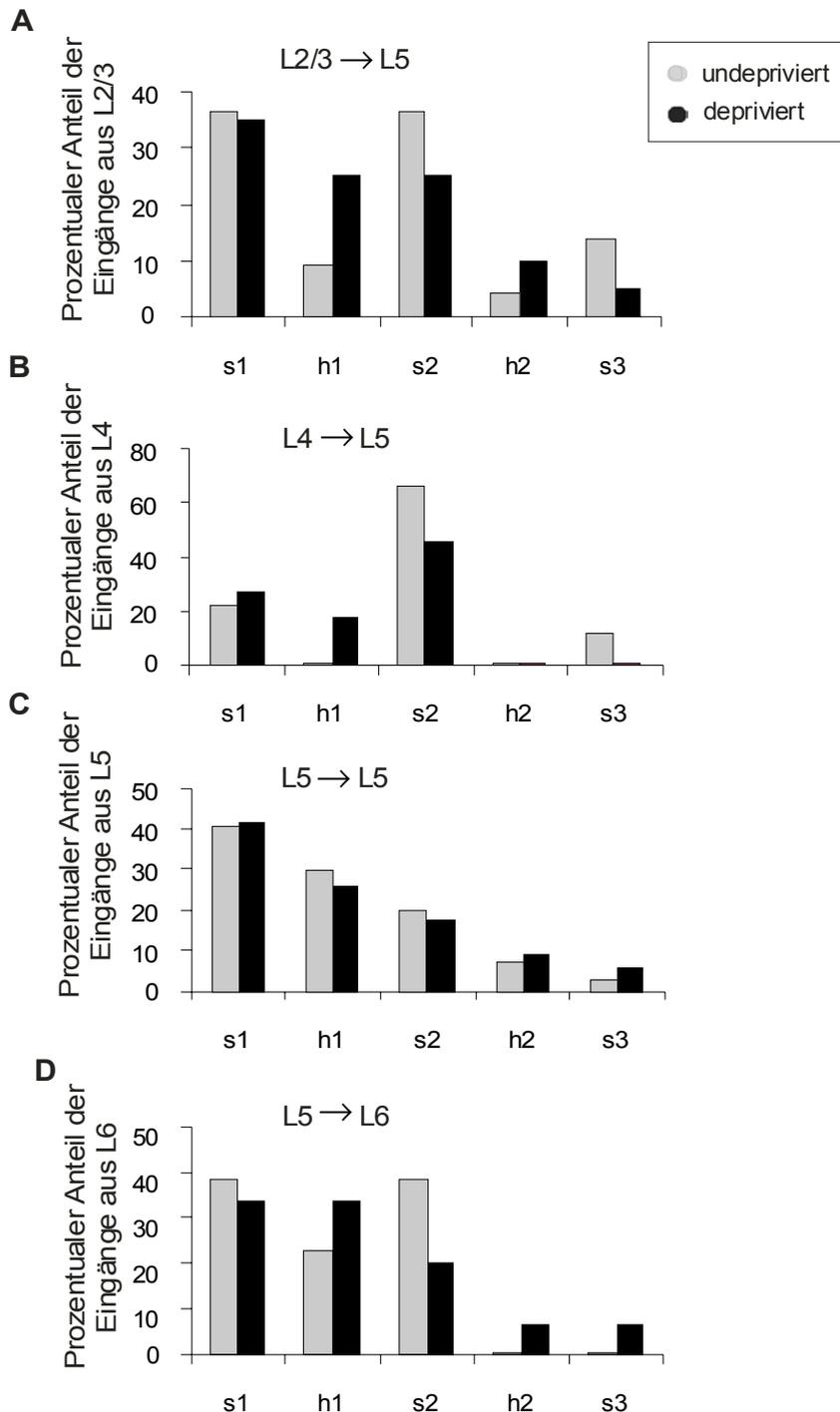
**Abbildung 3.16**

Verteilung der präsynaptischer Neurone, die auf L5 Pyramidenneuronen projizieren, über die Seiten- (s) bzw. Zentralbereiche (h) der Barrelkolumnen (x-Achse) und die verschiedenen Laminae (L) (z-Achse) vor (A) und nach (B) Deprivation.

Der Anteil der L4 → L5 Projektionen an der Gesamtheit der gesamten → L5 Projektionen war vor (6%) wie auch nach der sensorischen Deprivation (7%) gering. In Hirnschnitten von Tieren mit intakten Vibrissen stammten nahezu alle L4 → L5 Projektionen aus der Seite s2 des benachbarten Barrels. Nur wenige L4 → L5 Projektionen nahmen ihren Ursprung in den Barrel-Seiten s1 und s3. Nach Deprivation konnten weniger L4 → L5 Projektionen aus der Barrel-Seite s1 nachgewiesen werden (Abbildung 3.14, 3.16, 3.17). In Analogie zu den L2/3 → L5 Projektionen stieg dagegen die Häufigkeit von L4 → L5 Projektionen aus der Barrel-Höhle h1 geringfügig an, nicht jedoch aus h2. L4 → L5 Projektionen sind dadurch in Hirnschnitten deprivierter Tiere weniger differenziert über die Barrelstrukturen verteilt.

Die Häufigkeit der L6 → L5 Projektionen blieb unbeeinflusst von der sensorischen Deprivation (9%, vor Deprivation 10%) (Abbildung 3.14, 3.16, 3.17). Die räumliche Verteilung der präsynaptischen Neurone der L6 → L5 Projektionen änderte sich jedoch durch Deprivation. In Hirnschnitten von Tieren mit intakten Vibrissen waren die präsynaptischen Neurone ausschließlich in der angrenzenden L6 Barrel-Kolumne

lokalisiert. Nachdem die Vibrissen entfernt wurden, war diese strikte Abgrenzung nicht mehr ausgebildet. Stattdessen konnten → L5 Projektionen, die ihren Ursprung in der zweiten L6 Barrel-Kolumne hatten, nachgewiesen werden.



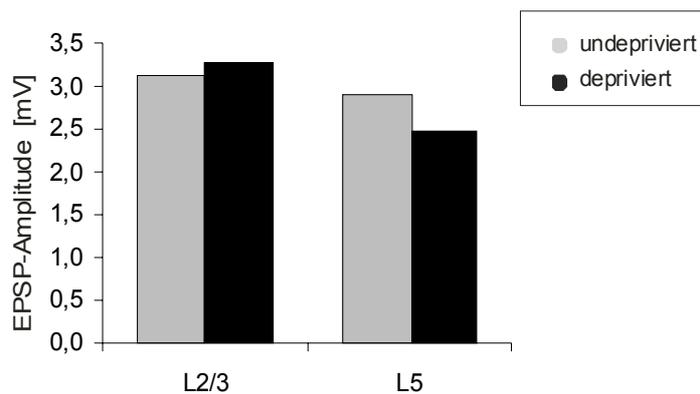
**Abbildung 3.17**

Prozentualer Anteil der auf L5 projizierenden Neurone der verschiedenen Laminae normalisiert auf die gesamte Anzahl der Eingänge der entsprechenden Lamina vor (hellgrau) und nach Deprivation (schwarz).

Unabhängig von der in den Barrel-Kortex eingehenden sensorischen Information waren im thalamokortikalen Hirnschnitt keine L1→L5 Projektionen nachweisbar (Abbildung 3.14).

Die quantitativen Anteile der verschiedenen Laminae bezüglich der gesamten → L5 Projektionen blieben folglich von der Reduktion der eingehenden sensorischen Information unbeeinflusst. Der größte Teil der auf L5 projizierenden, präsynaptischen Neurone war vor (90%) wie auch nach Deprivation (86%) innerhalb der ersten Barrel-Kolumne lokalisiert.

Die mittlere Amplitude der in Lamina 5 abgeleiteten EPSPs liegt bei 2,5mV (Median 2,8mV; Minimum 0,3mV; Maximum 12,0mV). Damit ist sie im Vergleich zum Mittelwert vor der sensorischen Deprivation, der bei  $2,9 \pm 0,8$ mV liegt, signifikant niedriger (Students t-Test,  $p < 0,001$ ) (Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18**

EPSP-Amplitude der abgeleiteten L2/3 und L5 Pyramidenneurone vor (hellgrau) und nach (schwarz) Deprivation.

Die pharmakologische Charakterisierung der von L5 Neuronen abgeleiteten EPSPs zeigte sich durch die sensorische Deprivation unbeeinflusst. Durch Applikation des nicht-NMDA-Rezeptor-Antagonisten NBQX ( $0,8\mu\text{M}$ ;  $n=4$ ) konnten die EPSPs von 3 Neuronen vor wie auch nach Deprivation völlig blockiert werden. Die EPSPs von einem Neuron zeigten einen durch NBQX nicht blockierbaren Anteil von  $10 \pm 2\%$  (gemessen am RMP) mit einer langsamen Kinetik. Die Applikation des NMDA-Rezeptor-Antagonisten D-APV ( $50\mu\text{M}$ ) reduzierte bei einem von 4 abgeleiteten Neuronen das EPSP um 1%. In den restlichen 3 Fällen änderte sich die Amplitude des EPSPs nach Zugabe von D-APV nicht. Daraus kann geschlossen werden, dass NMDA-Rezeptoren unter den gegebenen experimentellen Bedingungen auch nach sensorischer Deprivation nur zu einem sehr geringen Teil an der synaptischen Übertragung beteiligt

### **3.3 Neuronale Schaltkreise des Barrel-Kortex dargestellt durch intrinsische optische Signale (IOS)**

Ergänzend zur hochauflösenden Netzwerkanalyse mittels IR-gelenkter Photostimulation wurden die Interaktionen größerer Neuronengruppen untersucht. Um die synaptischen Verschaltungen mehrerer Neurone des Barrel-Kortex simultan innerhalb eines 2-3mm<sup>2</sup> großen Areals darzustellen, wurden deren intrinsisch optische Signale (IOS) gemessen. Nach elektrischer Stimulation verschiedener Laminae (L2-6) und verschiedener kolumnärer Strukturen (zentrale und periphere Bereiche der Kolumne) des Barrel-Kortex wurde die räumliche Ausbreitung des evozierten IOS analysiert (n=28 Tiere, 63 Schnitte). So liessen sich die räumlichen Muster der neuronalen Aktivität darstellen, die durch inter- und intralaminäre kortikale Verbindungen ausgelöst werden.

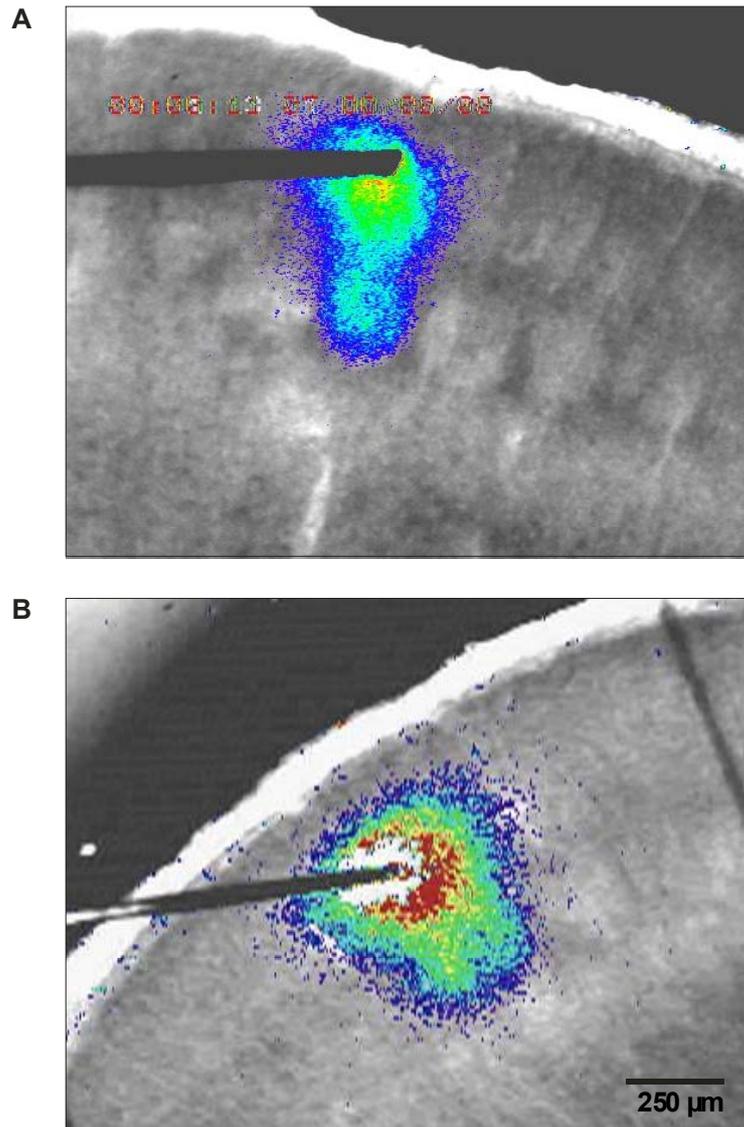
#### **3.3.1 Eigenschaften des IOS**

Der Zeitverlauf des IOS ist sehr langsam. Es erreicht seine maximale Intensität zwischen 3 und 7s nach der Stimulation und kann bis zu einer Minute andauern. Eine Erhöhung der Stimulationsintensität, -dauer oder -frequenz veränderte das räumliche Muster des IOS bis auf die etwas stärkere tangentielle Ausbreitung kaum. Eine Ausnahme von dieser Regel ergab die Stimulation von L4 (siehe Kapitel 3.3.3). Die Stärke des Signals und damit auch das Signal-Rausch-Verhältnis wurden jedoch durch höhere Stimulationsintensitäten gesteigert. Quantitativ erfasst wurde die Größe des IOS (Anzahl der Pixel, die ein über-schwelliges IOS aufwiesen, pro Gesamtzahl der Pixel) und dessen integrierte Intensität (Summe der Intensitätswerte der überschwelligen IOS-Pixel/maximal erreichbare Intensität).

Die räumliche Ausbreitung des IOS ist durch sensorische Deprivation nicht zu beeinflussen. Das heißt jedoch nicht, dass das IOS unabhängig von der eingehenden sensorischen Information ist, da die Amplitude des Signals vor und nach Deprivation nicht verglichen werden kann.

#### **3.3.2 IOS nach Stimulation supragranulärer Laminae**

Stimulation von Lamina 3 löste eine Aktivierung der L2/3 sowie L4 aus. Das Stimulationsmuster wies damit eine vertikale Orientierung auf. Ein deutlich unterschiedliches Signal ergab sich, wenn die zentralen oder die Randbereiche der L3 Barrel-Kolumne gereizt wurden. Im ersteren Fall hatte das IOS die Form einer auf dem Kopf stehenden Acht mit dem größeren Bauch in L2/3 und dem kleineren in L4 (Abbildung 3.19). Der aktivierte Bereich von L2/3 überschritt die Grenzen der Barrel-Kolumne nur geringfügig und enthielt komplett die über den Barrel-Seiten liegenden Areale. Der kleinere Bauch der Acht war deckungsgleich mit dem darunter liegenden L4 Barrel, dessen Grenzen nicht überschritten wurden. Die horizontale Ausbreitung des IOS in L2/3 war damit um  $22 \pm 5\%$  (n=5) größer als in L4.



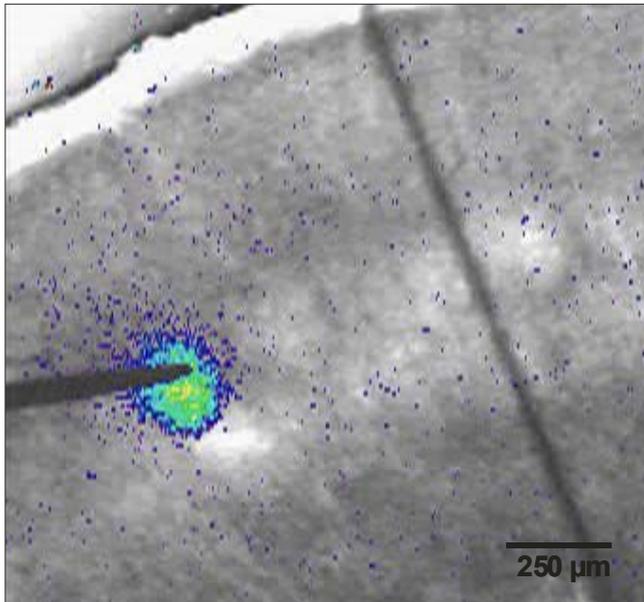
**Abbildung 3.19**

IOS bei Stimulation von L2/3 im zentralen (A) und peripheren Bereich (B) der Barrel-Kolumne.

Wurde die Stimulationselektrode in L2/3 über einer Barreelseite positioniert, resultierte ein IOS das sich, im Vergleich zum ersteren Fall, durch seitliche Spiegelung an der Kolumnen-Grenze, verdoppelt hatte. Das Signal erstreckte sich über die beiden angrenzenden Barrel-Kolumnen. Die aktivierte Fläche hat sich annähernd auf  $181 \pm 9\%$  verdoppelt. In 24% der Stimulationen von einer L2/3 Kolumnen-Seite wurde das weiter medial gelegene L4 Barrel nicht vollständig, in 9% überhaupt nicht aktiviert, so dass sich ein unsymmetrisches IOS ergab.

### 3.3.3 IOS nach Stimulation der granulären Lamina (L4)

Die zentrale Stimulation eines L4 Barrels zeigte in Abhängigkeit von der Reizstärke zwei unterschiedliche räumliche Muster des IOS. Niedere Spannungen aktivierten lokal die Barrel-Höhle, in der die Stimulationselektrode positioniert war, ohne dass das Signal auf die Seiten des Barrels oder andere Lamina übergriff (Abbildung 3.20).

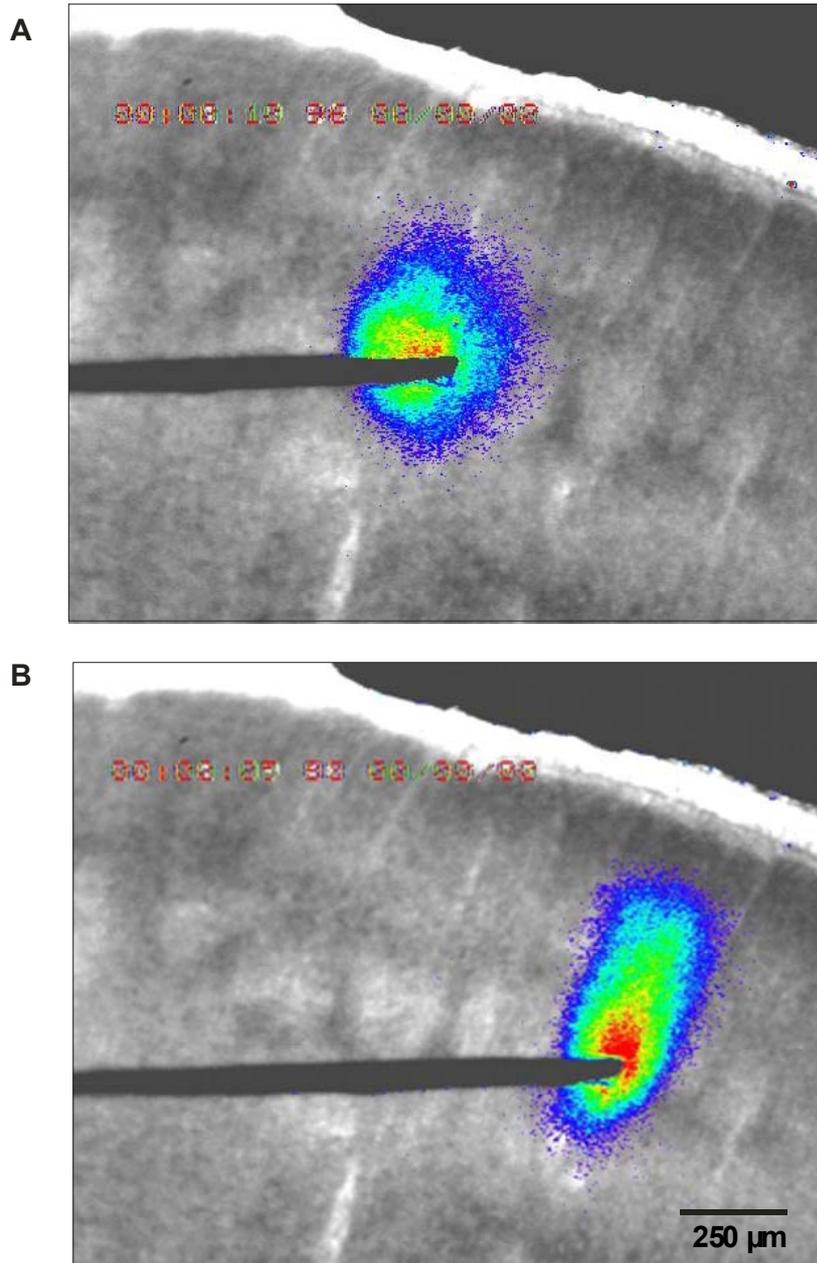


**Abbildung 3.20**

IOS bei zentraler Stimulation eines L4 Barrels mit einer niedrigen Reizstärke von 2V.

Höhere Spannungen aktivierten dagegen das komplette L4 Barrel inklusive der Seiten sowie die darüber liegenden Bereiche in L3 (Abbildung 3.21). Die Aktivierung von L5a war sehr gering. Das IOS war intrakolumnär und zeigte eine vertikale Ausbreitungsrichtung.

Die Stimulation der Barrel-Seite resultierte in einer Aktivierung des lateral angrenzenden Barrels. Das medial angrenzende Barrel wurde nur minimal aktiviert. Obwohl die Stimulationselektrode symmetrisch zwischen zwei Barrels positioniert wurde, war das IOS epizentrisch auf eines der beiden angrenzenden Barrels beschränkt. Stimulationen von L4 zeigten somit ein IOS mit intrakolumnärer Ausbreitung.



**Abbildung 3.21**

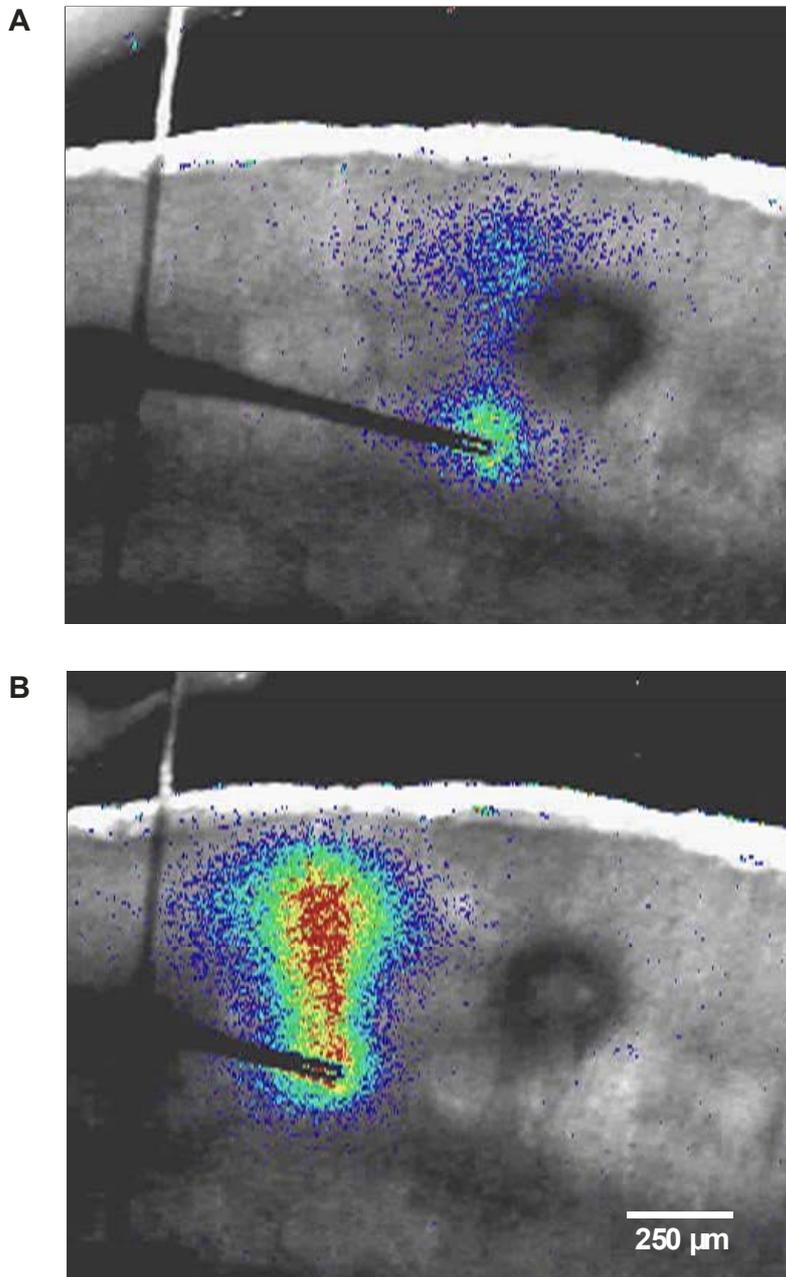
IOS bei peripherer (A) und zentraler (B) Stimulation eines L4 Barrels mit einer hohen Reizstärke von 5V.

### 3.3.4 IOS nach Stimulation infragranulärer Laminae

Die elektrische Stimulation von L5a in einem Bereich unterhalb der Barrel-Höhlen aktivierte von L5a bis L2 aufsteigend die gesamte Barrel-Kolumne (Abbildung 3.22). Innerhalb L3 greift das IOS auf benachbarte Barrel-Kolumnen über. Sonst blieb es jedoch auf die Kolumne beschränkt, innerhalb derer die Stimulationselektrode positioniert war. L1, 5b und 6 wurden nicht aktiviert. Wurden L5a Bereiche stimuliert, die unter einer Barrel-Seite lagen, ergab sich ein sanduhrförmiges IOS, das sich in L2/3 und 5a in die angrenzenden Barrel-Kolumnen ausbreitete. Die Engstelle des Signals lag in L4. Hier

beschränkte sich das IOS auf die Seiten der Barrels. Die Stimulation von L5a resultierte in beiden Fällen in einem vertikal orientierten Ausbreitungsmuster. Das IOS, das durch die Stimulation von L5b evoziert wurde, zeigte keine Abhängigkeit von der Position der Stimulationselektrode in Bezug auf die Kolumnen. Es breitete sich ellipsenförmig sehr lokal begrenzt von L5b nach L5a aus.

Die Stimulation von L6 resultierte in einem IOS, das dem von L5b sehr ähnlich war. Es stellt sich durch eine vertikal orientierte Ellipse dar, die auf L6 beschränkt war.

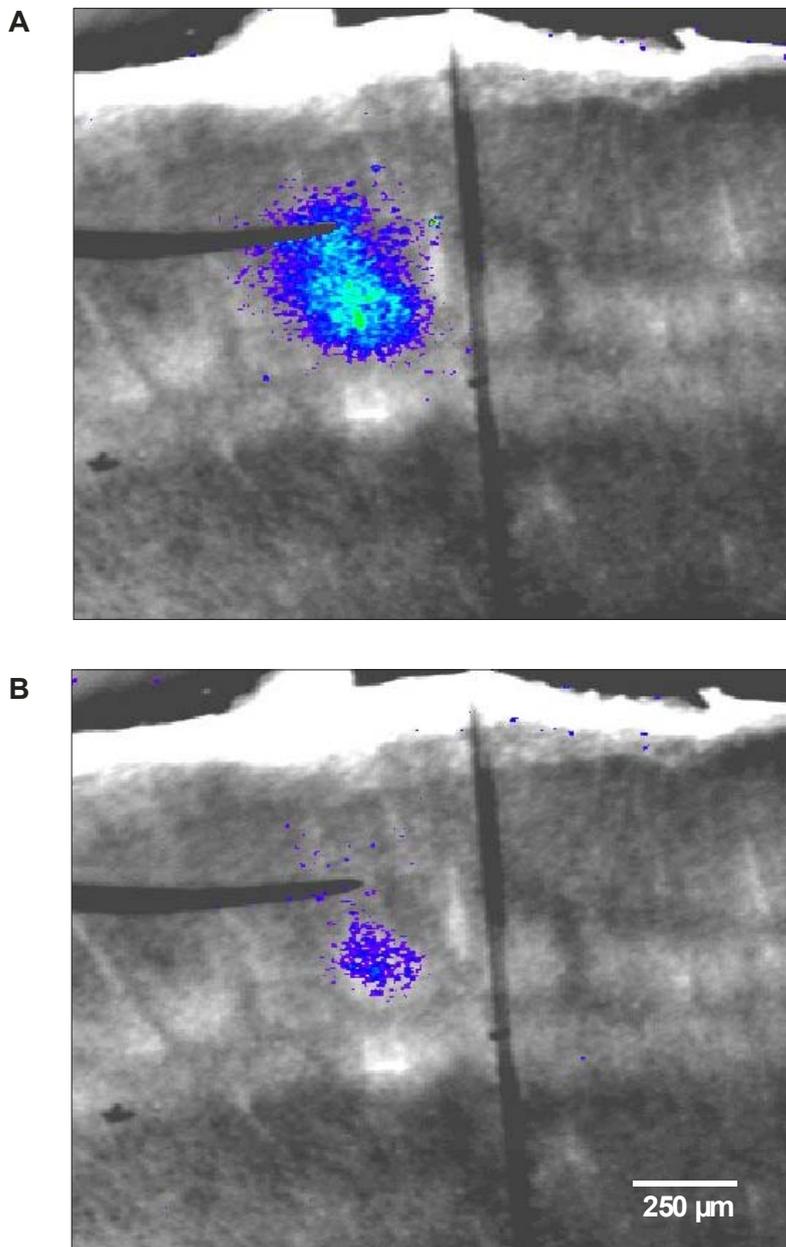


**Abbildung 3.22**

IOS bei Stimulation von L5 im peripheren (A) und zentrale Bereich (B) der Barrel-Kolumne.

### 3.3.5 Neuropharmakologische Charakterisierung des IOS

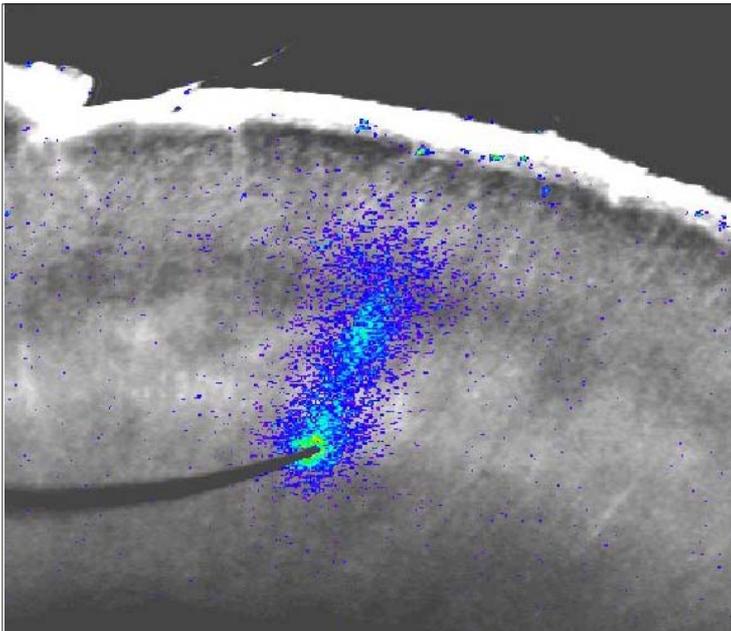
Um die Beteiligung verschiedener Rezeptoren an der Entstehung des intrakortikalen IOS zu analysieren, wurden verschiedene Antagonisten exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmitter verwendet. Der nicht-NMDA-Rezeptor-Antagonist NBQX ( $1\mu\text{M}$ ) ( $n=12$ ) reduzierte die Fläche des IOS gemittelt über alle Experimente auf  $6,9 \pm 0,2\%$  und dessen Intensität auf  $<0,1\%$  (Abbildung 3.23). Eine Korrelation zwischen dem Stimulationsort bzw. der Lokalisation des IOS und dem Maß der Reduktion des IOS war nicht zu beobachten. Der NMDA-Rezeptor-Antagonist D-APV ( $100\mu\text{M}$ ) reduzierte die IOS-Fläche um  $76,4 \pm 9\%$  der ( $n=8$ ). Es traten jedoch laminäre Unterschiede auf. Die Signale in den granulären und supragranulären Schichten, die sich durch Stimulationen von L2/3 und 4 ergaben, wurden stärker gehemmt als IOS, die sich durch Stimulation von L5a ergaben und sich über die gesamte Kolumne von L5 bis L2 erstrecken. Die Applikation von D-APV ( $100\mu\text{M}$ ) reduzierte die IOS-Fläche nach Stimulation von L2/3 und L4 auf  $10,7 \pm 2\%$  ( $n=5$ ), die nach Stimulation von L5a dagegen auf nur  $49,4 \pm 3\%$  ( $n=3$ ). Die gleichzeitige Applikation von D-APV und NBQX hemmte das IOS komplett, wurde es durch die Stimulation von L2/3 oder L4 ausgelöst. Die elektrischer Reizung von L5a ergab ein IOS, das sich durch die Kombination der beiden Glutamat-Rezeptor Antagonisten nicht völlig blockieren lies, sondern nur auf eine Fläche von  $5,3\%$  reduziert wurde.



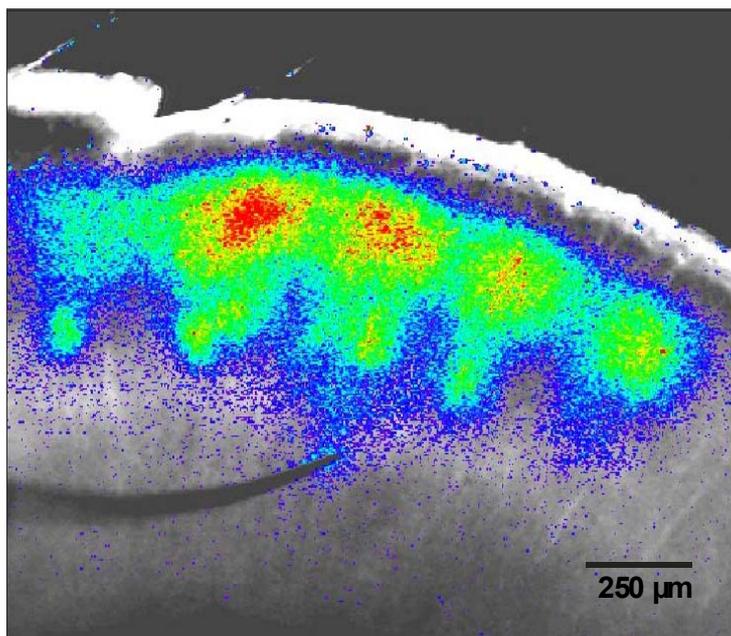
**Abbildung 3.23**  
IOS bei Stimulation von L2/3 vor (A) und nach Applikation von NBQX ( $1\mu\text{M}$ ) (B).

Die Applikation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockers PicROTOXIN (75µM, n=5) bewirkte, dass das IOS von einer Barrel-Kolumne auf mehrer übergriff (Abbildung 3.24). Die Aktivität breitete sich ausgehend von der direkt stimulierten Barrel-Kolumne über bis zu 6 Kolumnen in horizontaler Richtung symmetrisch aus. Die aktivierte Fläche wird um das 2,6- bis 4,7-fache gesteigert, die Intensität des IOS um das 5- bis 25-fache. Die interkolumnäre Weiterleitung erfolgte offensichtlich über L2/3, da sich hier ein lateral durchgehendes IOS zeigte. Bei Stimulation von L5a wurden in den Nachbarkolumnen neben L2/3 ebenso die Barrel-Höhlen aktiviert (Abbildung 3.24), was über L2/3 vermittelt wurde. L5a war nur in der direkt stimulierten Barrel-Kolumne aktiv. Bei Stimulation von L2/3 blieb das interkolumnäre Signal nach Applikation von PicROTOXIN auf L2/3 beschränkt. Das IOS von L4 blieb auf das in der stimulierten Kolumne liegende Barrel beschränkt. Eine interkolumnäre Aktivierung der Nachbarbarrels konnten durch den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blocker nicht bewirkt werden.

A



B

**Abbildung 3.24**

IOS bei Stimulation von L5 vor (A) und nach Applikation von PicROTOXIN (75µM) (B).

Die Applikation des spezifischen GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisten CGP35348 (200µM) hatte einen weit weniger starken amplifizierenden Effekt. Die horizontale Ausbreitung des IOS konnten durch CGP35348 in allen aktiven Laminae nur leicht gesteigert werden. Die aktivierte Fläche wurde um das 1,2-fache erhöht, die Intensität des IOS nahm um das 1,2- bis 1,3-fache zu. Es wurden im Gegensatz zu Picrotoxin jedoch keine zusätzlichen Kolumnen oder gar Laminae aktiviert

## 4. Diskussion

### 4.1 Elektrophysiologische Eigenschaften der untersuchten Neurone

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Infrarot-Videomikroskopie identifizierte L5 und L2/3 Pyramidenneurone am Soma abgeleitet. Eine elektrophysiologische Charakterisierung der Nervenzellen erfolgte anhand des RMPs, der AP-Amplitude, des Eingangswiderstandes und der anomalen Rektifizierung. Die Mittelwerte dieser Parameter (siehe Kapitel 3.1) entsprechen den Ergebnissen anderer Studien (Burgard und Hablitz, 1993; Stuart et al., 1993; Stuart und Sakmann, 1994, 1995; Gottlieb und Keller, 1997; Stuart und Spruston, 1998; Eder, 2000). Alle untersuchten Neurone zeigten das typische Entladungsmuster von RS ("regular spiking")-Neuronen (Connors und Gutnick, 1990). Unterschiede zwischen den Pyramidenzellen der L2/3 und der L5 zeigten sich jedoch deutlich im RMP, der AP-Amplitude und dem Eingangswiderstand. RS-Neurone des Barrel-Kortex können somit nicht als homogene Neuronenklasse angesehen werden, da ihre morphologischen (Gottlieb und Keller, 1997) und physiologischen Charakteristika entsprechend der laminären Lokalisation variieren.

Als IB ("intrinsically bursting")-Neurone konnten nur wenige Zellen (n=3) der L5b identifiziert werden, die jedoch von der Auswertung ausgeschlossen wurden, um eine möglichst einheitliche Neuronengruppe zu untersuchen. In L2/3 konnten keine IB-Neurone abgeleitet werden, was auf eine inhomogene Verteilung der physiologisch typisierbaren Pyramidenneurone (IB- und RS-Neurone) im Neokortex hindeutet. Zahlreiche Studien (Chagnac-Amitai et al., 1990; Larkman und Mason, 1990; Agmon und Connors, 1992) unterstützen die Annahme, dass IB-Neurone vorwiegend in L5b, nicht jedoch in supragranulären Laminae vorkommen.

Neokortikale Pyramidenneurone besitzen spannungsabhängige, für Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen permeable Ionenkanäle, die durch Hyperpolarisation aktiviert werden. Diese einwärts-gerichteten Membrankanäle vermitteln den so genannten I<sub>h</sub>-Strom ("hyperpolarization-activated current"), der depolarisierend wirkt und somit das Neuron repolarisiert (zur Übersicht siehe Pape, 1996). Interessanterweise konnte bei der Auslenkung des Membranpotentials durch Injektion von negativem Strom der für den I<sub>h</sub>-Strom typische "Sag" nur bei wenigen Neuronen beobachtet werden. Wenn überhaupt, dann trat der I<sub>h</sub>-Strom erst ab einem Membranpotential von ungefähr -70mV auf. Diese Beobachtung steht mit den Ergebnissen der Arbeit von Eder (2000) im Einklang. Für die Experimente dieser Studie wurden ebenfalls 2-3 Wochen alte Ratten verwendet. Die Ableitung der Neurone erfolgte bei Raumtemperatur. Im Gegensatz dazu zeigten Stuart und Spruston (1998), dass die durch den I<sub>h</sub>-Strom vermittelte Repolarisation neokortikaler L5 Pyramidenneurone reproduzierbar bei einem Membranpotential von ungefähr -60mV auftritt. Diese Versuche wurden allerdings an Neuronen älterer Tiere und bei einer höheren Temperatur durchgeführt. Die Stärke der Depolarisation durch den I<sub>h</sub>-Strom scheint demnach vom Alter der Nervenzellen und/oder der Temperatur abhängig zu sein.

## 4.2 Methodische Aspekte der angewandten Techniken

### 4.2.1 Kartierung neuronaler Somata durch IR-gelenkte Photostimulation

Das komplexe Neuropil des Neokortex mit seinen ineinander verwobenen dendritischen und axonalen Fasern unterhält Tausende von Synapsen (Gilbert und Wiesel, 1983; Chapin et al., 1987; Burkhalter, 1989; Schuz und Palm, 1989; Anderson et al., 1994; Deuchars et al., 1994). Um besser verstehen zu können, wie die sensorische Information übermittelt und verarbeitet wird, ist es nötig die Kommunikationswege zwischen den Neuronen detailliert zu analysieren. Die meisten Einblicke in die Organisation neuronaler Netzwerke lieferten bisher anatomische Studien. Intrazelluläre Ableitungen und Färbungen stellen die Projektionsmuster verschiedener Klassen kortikaler Neurone dar (Gilbert, 1983; Martin und Whitteridge, 1984; Katz, 1987). Die Kombination von intrazellulären Färbungen mit elektronenmikroskopischen Methoden ermöglicht es sogar, einige der postsynaptischen Zielstrukturen zu identifizieren (Somogyi et al., 1983; McGuire et al., 1991). Histologisch-anatomische Techniken schaffen zwar einen Überblick über die vorhandenen axonalen Projektionen, liefern jedoch keine Informationen über die physiologisch aktiven Verbindungen und deren funktionelle Eigenschaften. Zur Charakterisierung funktionaler synaptischer Verbindungen werden physiologische Methoden, wie zum Beispiel Doppelableitungen, angewandt (Malinow, 1991; Thomson et al., 1996; Markram, 1997). Diese Technik hat jedoch den Nachteil, dass sie sehr aufwendig ist, da selbst in einem kleinen Volumen neuronalen Gewebes Hunderte von Stellen auf eine eventuelle synaptische Verbindung zu einem bestimmten Neuron hin getestet werden müssten, um ein repräsentatives Bild der Eingänge zu erhalten. Sowohl der Einsatz von iontophoretischen Pipetten wie auch von Elektroden ist allerdings nur für eine begrenzte Anzahl von Stimulationsorten praktikabel. Dies trifft auf die Verwendung von einzelnen Elektroden wie auch von Multi-Elektroden-Arrays zu. Ein weiterer Nachteil von Mehrfachableitungen ist die mechanische Beschädigung des Gewebes, die mit steigender Anzahl der Ableitorte zunimmt. Francis H. Crick formulierte schon 1979 dieses methodische Manko folgendermaßen: "...a method that would make it possible to inject one neuron...that would then clearly stain all the neurons connected to it...would be invaluable." Eine Technik, die diesen Anforderungen annähernd gerecht wird, ist die Photostimulation (Farber und Grinvald, 1983). Mit ihrer Hilfe ist es möglich, die zur abgeleiteten Zelle präsynaptischen Neurone zu lokalisieren und deren Verbindung funktionell zu charakterisieren. Die Photostimulation bietet den Vorteil, dass sehr große Bereiche neuronalen Gewebes schnell und einfach nach synaptisch gekoppelten Zellen durchsucht werden können. Eine mechanische Beschädigung tritt dabei nicht auf.

Die IR-gelenkte Photostimulation ist eine räumlich hochauflösende Methode, die es ermöglicht Neuronenstrukturen wie einzelne Somata, aber auch Dendriten unter visueller Kontrolle zu stimulieren. Für die topographische Kartierung präsynaptischer Neurone bezüglich eines abgeleiteten, postsynaptischen Neurons ist es essentiell, spezifisch neuronale Somata und nicht deren Dendriten zu stimulieren. Da die Dendriten sich im Neokortex stark verzweigen und bis zu 1 Millimeter lang werden können (Gilbert und Wiesel, 1983; Chapin et al., 1987; Burkhalter, 1989; Schuz und Palm, 1989; Anderson et al., 1994; Deuchars et al., 1994), würde ihre Stimulation kein sinnvolles Muster präsynaptischer Elemente ergeben. Mit Hilfe des Somas kann das Neuron einer Lamina zugeordnet werden, wodurch Rückschlüsse auf das Innervationsmuster und die physiologischen Charakteristika des Neurons gezogen werden können (Gottlieb und Keller, 1997). Dieser Aspekt der somaspezifischen Stimulation wurde in vielen Studien, die mit Hilfe der Photostimulation die synaptischen Verbindungen neuronaler Komponenten funktionell kartierten, nicht oder nur ungenügend berücksichtigt (Callaway und Katz, 1993; Dalva und Katz, 1994; Katz und Dalva, 1994; Katz und Shatz, 1996; Kötter et al., 1998; Staiger et al., 2000; Schubert et al., 2001). Um spezifisch neuronale Somata zu stimulieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Barrel-Kortex unter visueller Kontrolle nach synaptisch gekoppelten Neuronen durchsucht. Dazu wurde, wie auch von

Kötter et al. (1998) vorgeschlagen, die Photostimulation mit IR-Videomikroskopie (Dodt und Zieglgänsberger, 1990, 1994; Dodt et al., 2002) kombiniert (IR-gelenkte Photostimulation). Hierdurch kann festgestellt werden, ob an den Stimulationsorten, die synaptische Eingänge liefern, die Somata oder Dendriten der präsynaptischen Neurone lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu stimulierten Katz und Mitarbeitern „blind“, d.h. ohne visuelle Kontrolle (Callaway und Katz, 1993; Dalva und Katz, 1994; Katz und Dalva, 1994; Katz und Shatz, 1996). Dadurch entsteht jedoch ein weit weniger detailliertes Bild der synaptischen Verbindungen von Neuronen. Das spiegelt sich auch in dem von Katz und Mitarbeitern benutzten unspezifischen Terminus „presynaptic site“ (präsynaptische Stelle), der in dieser Arbeit durch den präziseren Ausdruck „präsynaptisches Neuron“ ersetzt werden kann. Besonders an Bedeutung gewinnt die visuelle Kontrolle der Photostimulation durch die so genannten „hot spots“ am apikalen Dendriten von L5 Pyramidenneuronen. Sie zeichnen sich durch eine höhere Glutamatsensitivität im Vergleich zu unmittelbar benachbarten Membranarealen wie auch im Vergleich zum Soma aus (Frick et al., 2001). Werden die dendritischen hot spots stimuliert, liefern sie um ein Vielfaches stärkere Antworten als die somatische Stimulation desselben Neurons. Somit wird die Darstellung synaptisch gekoppelter Neurone dahingegen verfälscht, dass nicht präsynaptische Somata, sondern präsynaptische hot spots von Dendriten kartiert werden. Durch die Visualisierung neuronaler Somata kann dies vermieden werden.

Wie in der dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wird die Somaspezifität am stärksten durch die Fläche der stimulierten Membran beeinflusst. Um diesen Faktor zu optimieren, wurden das Soma und proximale Stellen am Dendriten des abgeleiteten Neurons durch Laserpunkte verschiedener Größe stimuliert. Je mehr Energie am Dendriten im Vergleich zum Soma benötigt wird ein AP auszulösen, desto somaspezifischer ist die Photostimulation. So konnte in Vorexperimenten gezeigt werden, dass bei einem Durchmesser der beleuchteten Membranfläche von  $8\mu\text{m}$ , die größte Somaspezifität erzielt wird. Dieser Wert entspricht etwa der Somagröße kortikaler Pyramidenneurone. Dadurch erhält man das größtmögliche Verhältnis der stimulierten Membranfläche am Soma zu der am Dendriten (Abbildung 3.2). Die Photostimulation erreicht folglich ihre größte Somaspezifität beim Maximalwert dieses Flächenverhältnisses. Bei der Verwendung kleinerer Laserpunkte ist pro stimulierte Flächeneinheit eine höhere Intensität nötig, die sehr leicht auch am Dendriten AP auslösen kann. In einer vergleichbaren Studie von Schubert et al. (2001) wurden hingegen Flächen stimuliert, die größer waren als ein neuronales Soma. Dadurch wurden größere dendritische, nicht jedoch somatische Membranbereiche stimuliert. Das Verhältnis der stimulierten Membranfläche am Soma zu der am Dendriten nimmt somit ab. Dies hat eine geringere Somaspezifität zur Folge, wodurch wichtige Ergebnisse dieser Arbeit, wie die Periodizität der L2/3  $\rightarrow$  L5 Projektionen, von Schubert et al. (2001) nicht werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Somaspezifität durch folgendes Experiment bestätigt (siehe Kapitel 3.2.3). Das Soma eines mittels Photostimulation identifizierten präsynaptischen Neurons wurde simultan mit dem postsynaptischen Neuron abgeleitet (Doppelableitung). APs dieses präsynaptischen Neurons evozierten in der postsynaptischen Zelle ebenfalls EPSPs. Dieses Experiment zeigt weiterhin, dass sich die IR-gelenkte Photostimulation als Methode zum Nachweis synaptisch gekoppelter Neuronen eignet, deren Verbindung durch Doppelableitung beider Neurone elektrophysiologisch weiter untersucht werden kann. Bisher geschieht diese Suche gekoppelter Neuronenpaare dadurch, dass mutmaßlich präsynaptischen Neurone im „cell-attached“-Modus stimuliert werden (Feldmeyer et al., 1999a, b; Feldmeyer und Sakmann, 2000; Feldmeyer et al., 2002). Dies ist jedoch eine zeitaufwendige Methode, bei der die Zellen zudem mechanisch beschädigt werden (siehe Kapitel 4.2.1, Absatz 1).

Ein weiterer Faktor, der die Somaspezifität der Photostimulation beeinflussen kann, ist die Art der Beleuchtungsquelle, die zum „uncaging“ des Glutamats benutzt wird. Schubert et al. (2001) benutzten für ihre Netzwerkanalysen im Barrel-Kortex eine UV-Quecksilberlampe statt eines Argon-Ionenlasers. Mit Hilfe des Lasers ist es im Vergleich zur Quecksilberlampe möglich, auf kleinen Flächen (Durchmesser  $<50\mu\text{m}$ ) eine höhere Leistung zu erzielen. Die Freisetzungsrates von Glutamat ist dadurch bei optimaler Größe der stimulierten Membranfläche ( $8\mu\text{m}$ ) höher. Schubert et al. (2001) erhielten durch die

geringere Reizstärke pro Flächeneinheit ihrer Photostimulation ein weit weniger detailliertes Bild über die präsynaptischen Komponenten von L5 Pyramidenneuronen.

Durch die geschilderte Optimierung der somaspezifischen Photostimulation konnte im Vergleich zu ähnlichen Studien (Schubert et al., 2001; Svoboda, 2002) das Verteilungsmuster der auf L2/3 und L5 projizierenden Neurone detaillierter dargestellt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen präsynaptische Neurone zwar stimuliert, jedoch aufgrund einer geringen Erregbarkeit durch Glutamat in diesen Neuronen keine APs ausgelöst wurden. Dieses methodische Problem könnte dadurch gelöst werden, dass dasselbe Kortexareal mit unterschiedlichen Laserintensitäten abgerastert wird. Diese Vorgehensweise würde jedoch die Gefahr der Aktivierung von polysynaptischen Verbindungen erhöhen und wurde aus diesem Grund nicht praktiziert.

Eine weitere Verbesserung der Somaspezifität der IR-gelenkten Photostimulation könnte durch die Verwendung von „bi-caged“ Substanzen (Pettit, 1997; Callaway und Yuste, 2002) erreicht werden. Die Photolyse von Glutamat aus bi-caged Glutamat wird durch einen zwei-Photonen-Prozess ermöglicht, d.h. um ein Glutamatmolekül zu aktivieren, werden zwei Photonen statt nur einem benötigt. Damit sollte die räumliche Auflösung der Photostimulation verbessert werden und das Streulicht ober- und unterhalb des stimulierten Neurons kein Glutamat freisetzen. Eigenen Kontrollversuchen zufolge wird die Somaspezifität durch die Photolyse von bi-caged Glutamat jedoch nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Eine punktuelle, photolytische Freisetzung von Glutamat könnte mit Hilfe eines zwei-Photonen-Laser erzielt werden, der einen nicht-linearen zwei-Photonen-Prozess ermöglicht (Dodt et al., 2002). Derzeit stehen jedoch noch keine caged Substanzen kommerziell zur Verfügung, die sich durch einen zwei-Photonen-Laser aktivieren lassen.

#### 4.2.2 Das intrinsisch optische Signal (IOS)

Die Messung des IOS in Hirnschnitten ermöglicht es, die Ausbreitung der neuronalen Aktivität über große Areale zu beobachten. Dadurch können Interaktionen zwischen einer Vielzahl von Neuronen bzw. Neuronengruppen dargestellt werden. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist es noch nicht völlig geklärt, welche Mechanismen die Entstehung des IOS begründen. Es handelt sich um ein aktivitätsabhängiges Signal, das durch die veränderte Lichtstreuung des neuronalen Gewebes entsteht (siehe Kapitel 2.6). Dabei spiegelt das IOS die Änderungen der Ionenkonzentration des extrazellulären Raumes wider (McVicar und Hochmann, 1991; Holthoff und Witte, 1996; Buchheim et al., 1999; Müller und Somjen, 1999; Kohn et al., 2000; Witte et al., 2001). Es wird angenommen, dass die wiederholte Aktivierung von Neuronen durch tetanische Stimulation zu einer Anreicherung von Kalium im Extrazellulärraum führt, die teilweise durch die umgebende Glia abgepuffert wird. Der Aufnahme des Kaliums durch Ionenpumpen, -transporter und -kanäle der Gliazellen (Newman, 1993) führt zu einem osmotischen Wassereinstrom, der ein Anschwellen der Astrozyten bewirkt. Das Glia-Schwellungs-Modell des IOS basiert auf den folgenden experimentellen Beobachtungen: (a) Sowohl Furosemid als auch eine  $\text{Cl}^-$ -Ionen freie Extrazelluläre Lösung blockieren das IOS. Die beruht möglicherweise auf einer Blockade der  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Transporter der Astrozyten (McVicar und Hochmann, 1991; Holthoff und Witte, 1996; Witte et al., 2001). (b) Der Zeitverlauf der Änderungen des Extrazellulärraumes ist mit dem Zeitverlauf des IOS sehr eng korreliert (Holthoff und Witte, 1996). (c) Aktivitätsabhängige Änderungen im Extrazellulärraum des optischen Nervs der Ratte treten nur nach bereits erfolgter Ausdifferenzierung der Astrozyten auf (Ransom, 1985).

Ob Neurone ebenso durch osmotisches Anschwellen direkt zur Entstehung des IOS beitragen ist fraglich. Trotz eines nachweislichen Einstroms von  $\text{Cl}^-$ -Ionen (Aitken et al., 1999) sind Neurone im Vergleich zu Astrozyten für Schwellungsvorgänge weit weniger anfällig (Kohn et al., 2000; Witte et al., 2001). Gesichert ist lediglich, dass das *in vitro* wie auch *in vivo* aufgezeichnete IOS von neuronaler synaptischer Aktivität abhängt. Das

Entfernen von  $\text{Ca}^{++}$  aus der Badlösung bewirkt dementsprechend eine völlige, aber reversible Blockade des Signals (Kohn, 1997; McVicar und Hochmann, 1991). Ebenso führt die Applikation der Glutamatrezeptor-Antagonisten D-APV, NBQX (Kapitel 3), CNQX (6-Zyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) (Dodt et al., 1996) oder von Kynurensäure (McVicar und Hochmann, 1991) zu einer starken Abschwächung des IOS.

Das IOS spiegelt somit das Membranpotential nicht direkt wider, sondern nur sekundäre Effekte neuronaler Aktivität. Dadurch stellt sich die Frage, in wie weit eine Korrelation zwischen der Potentialänderung und dem IOS besteht. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass das IOS deckungsgleich mit der räumlichen Verteilung extrazellulär abgeleiteter Potentiale ist (zur Übersicht siehe Holthoff und Witte, 1996; Peixoto et al., 2001; Cerne und Haglund, 2002). Darüber hinaus lässt sich eine Korrelation zwischen der Intensität des IOS und der Amplitude des Feldpotentials nachweisen (Holthoff et al., 1994; Dodt et al., 1996; Kohn et al., 1997). Dies ist jedoch nur in den zentralen Bereichen des IOS möglich, nicht in dessen Randbereichen. Verschiedene Studien bestätigten die Annahme, dass die zentralen Bereiche des IOS überschwellige neuronale Aktivität widerspiegeln, die Randbereiche dagegen unterchwellige Aktivität (Das und Gilbert, 1995; Toth, 1996; Peterson et al., 1998; Cerne und Haglund, 2002).

Bei der Ableitung neuronaler Aktivität mittels Visualisierung des IOS kann auf die Benutzung von Farbstoffen verzichtet werden. Dies trägt erheblich zur Vitalität der Hirnschnitte bei. Der Zeitverlauf des IOS ist jedoch um einige Größenordnungen langsamer als der des elektrischen Signals. Dies ist ein Nachteil den spannungsabhängige Farbstoffe nicht aufweisen. Eine bis jetzt noch nicht praktizierte Erweiterung der Methode stellt die Kombination des IOS mit Patch-Clamp Ableitungen dar. Dies würde sowohl hochauflösend die intrazellulären Potentialänderungen sowie über ein großes Areal hinweg die extrazellulären Potentialänderungen darstellen.

### 4.3 Funktionalität neuronaler Netzwerke

Durch die integrative Aktivität neuronaler Netzwerke wird sensorische Information im Neokortex übertragen, verarbeitet und gespeichert. Die Neurone des Neokortex sind durch konvergente und divergente Verbindungen miteinander vernetzt. Auf eine einzelne Pyramidenzelle des menschlichen Neokortex verschalten 40.000 Synapsen (Abeles, 1994). Wenigstens 70% der exzitatorischen Synapsen an Pyramidenzellen werden von kortikalen Neuronen gebildet (White und Keller, 1989).

Die Kopplung von Neuronen zu lokalen Verarbeitungseinheiten ermöglicht eine effektive Informationsverarbeitung. Szentágothai schlug 1978 vor, dass der kortikalen Funktionalität ein fundamentales Prinzip neuronaler Verschaltung zu Grunde liegt. Funktionelle Unterschiede zwischen kortikalen Gebieten seien auf Unterschiede in der Herkunft der Afferenzen und Efferenzen zurückzuführen (Peters und Sethares, 1991). Douglas und Mitarbeiter schreiben die evozierten Antworten einzelner Neurone des visuellen Kortex einem „canonical microcircuit“ zu (Douglas und Martin, 1990; Douglas et al., 1996). Ein einzelnes Neuron erhält nicht genügend thalamische Eingänge, um direkt so stark aktiviert zu werden, wie in den Experimenten von Douglas und Martin beobachtet. Die vom Thalamus initiierte neuronale Erregung wird durch aufeinander folgende intrakortikale Verarbeitungsschritte verstärkt (Stratford et al., 1996). Diese intrakortikale Amplifikation erfolgt durch lokale, exzitatorische Pyramidenneurone. Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der integrativen Fähigkeiten des Neokortex stellt die Aufklärung der Verschaltungsmuster von Pyramidenneuronen verschiedener Laminae und Kolumnen dar.

Informationsverarbeitung erfordert eine starke synaptische Verknüpfung kooperierender Neurone wie sie zwischen exzitatorischen Pyramidenzellen gegeben ist. Ziel dieser Arbeit war es, diese Konnektivität zu untersuchen. Es ergab sich, dass im Durchschnitt drei der stimulierten Neurone mit den abgeleiteten L5 Pyramidenneuronen verbunden sind. Für Projektionen zu L2/3 Pyramidenneuronen liegt dieser Wert bei zwei. Aus folgenden

Gründen spiegeln diese Werte nicht die vollständige Konnektivität der untersuchten Neuronengruppen wider. 1) Potentiell präsynaptische Neurone, die wesentlich tiefer als das abgeleitete Neuron im Hirnschnitt lagen, konnten experimentell bedingt nicht berücksichtigt werden. Tiefer als 100µm im Hirnschnitt liegende Neurone können mit IR Videomikroskopie nicht visualisiert werden. 2) Projektionen, die außerhalb der Schnittebene verliefen, wurden durch die Präparation durchtrennt.

In der Literatur wurde die Anzahl der auf ein einzelnes L2/3 Pyramidenneuron projizierenden exzitatorischen Synapsen im Durchschnitt mit 8.900 bestimmt. Dieser Wert liegt für L5 Pyramidenneurone höher (12.500) (Larkman, 1991). Weiterhin wurde die Anzahl der Synapsen pro verbundenes Neuronenpaar auf 6 geschätzt (Martin, 1984; Gabbott et al., 1987; Markram et al., 1997). Rechnerisch ergibt sich daraus eine Gesamtzahl von 890 präsynaptischen Neuronen für L2/3 Pyramidenzellen und 1.250 für L5 Pyramidenzellen. Hieraus folgt eine stärkere synaptische Vernetzung der L5 Pyramidenneurone im Vergleich zu Pyramidenneurone der L2/3. Die Stärke der synaptischen Verbindungen (mittlere EPSP-Amplitude) ist für L5 Neurone im Vergleich zu L2/3 Neuronen jedoch geringer. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass Synapsen auf L5 Pyramidenneurone weiter distal am Dendriten verschalten. Diese Hypothese setzt voraus, dass die Anzahl der Synapsen von L5 und L2/3 Pyramidenneurone gleich groß ist und keine aktiven dendritischen Leitfähigkeiten bei der Weiterleitung des elektrischen Signals beteiligt sind. Die langen apikalen Dendriten der L5 Pyramidenneurone, die alle darüber liegenden Laminae durchlaufen, sowie die sich über mehrere 100µm lateral ausbreitenden basalen Dendritenbäume liefern die anatomische Voraussetzung für die weitreichenden intrakortikalen Verbindungen dieser Neuronenklasse. Die Stärke der präsynaptischen Antwort auf Glutamatapplikation kann jedoch aufgrund unterschiedlicher Glutamatsensitivität variieren. Zur Aufklärung der exakten Lokalisation einer Synapse bzw. der dendritischen Integration eines synaptischen Eingangs sind deshalb Methoden erforderlich, mit denen sowohl die Aktivität des prä- und postsynaptischen Neurons gemessen werden kann. Doppelableitungen stellen eine solche Methodik dar. Mit Hilfe dieser Technik wiesen Nicoll und Blakemore (1993) für L5 Verbindungen eine geringerer EPSP-Amplituden nach als für L2/3 Verbindungen. Dieser Unterschied zu den vorliegenden Daten könnte darin begründet sein, dass mittels Doppelableitungen nur sehr lokal begrenzte intrakortikale Verbindungen untersucht werden können.

#### **4.4 Vertikale synaptische Verschaltungen innerhalb einer Kolumne**

Eine kortikale Kolumne stellt ein funktionelles Modul dar, das eingehende, sensorische Informationen einheitlich verarbeitet (Mountcastle, 1997). Im primären somatosensorischen Kortex wird die Kolumne über gemeinsame Eigenschaften bezüglich des rezeptiven Feldes (RF-Eigenschaften) definiert. Aufgrund der somatotopen Repräsentation der Vibrissen im Barrel-Kortex kann jede Vibrisse einem eigenen Verarbeitungsmodul innerhalb einer Kolumne zugeordnet werden. Die Barrel-Kolumne ist jedoch nicht nur eine durch die sensorischen Eingänge bestimmte Einheit. Um die sensorische Information modular verarbeiten zu können, müssen die intrakortikalen Verbindungen ebenso modular gestaltet sein. Nach den vorliegenden Daten verlaufe die überwiegende Anzahl intrakortikaler Verbindungen des Barrel-Kortex vertikal innerhalb der Barrel-Kolumne. 80% der synaptischen Verbindungen von L2/3 und 60% von L5 sind intrakolumnär. Neuronale Schaltkreise verbinden sowohl infra- und supragranuläre Laminae als auch Lamina 4 einer funktionellen Kolumne reziprok miteinander. Diese intrakortikalen Verschaltungen innerhalb einer Barrel-Kolumne sind durch das säulenförmige IOS nach Stimulation von L5 belegt, das sich von L1 bis L5 erstreckt. Anatomische Daten aus Golgi-Studien (Lorente de Nó, 1938), anterograden Degenerationsstudien (Akers und Killackey, 1978) und antero- sowie retrograden Fasermarkierungsstudien (Chapin et al., 1987; Fonesca et al., 1988; Bernardo et al.,

1990a, b) stützen diesen Befund. Elektrophysiologische Daten belegen die radiale Übertragung sensorischer Information innerhalb der Barrel-Kolumne mittels der Latenzzeiten nach Stimulation einer Vibrisse, die für L4 am kürzesten und für die supra- und infragranulären Laminae entsprechend länger sind (Armstrong-James et al., 1992). Die modulare, intrakortikale Konnektivität der vertikalen Barrel-Kolumne spiegelt sich auch in ihrer einheitlichen metabolischen Aktivität wider. Die selektive Stimulation von Vibrissen bzw. deren Deprivierung resultieren in einem Anstieg bzw. einer Reduktion der 2-Deoxyglukose-Markierung, nicht nur in den thalamokortikalen Zielgebieten, sondern der gesamten Barrel-Kolumne (Chmielowska et al., 1986; Kossut et al., 1988; Levin und Dunn-Meynell, 1991; Welker et al., 1992; Jacquin et al., 1993a; Woolsey et al., 1996).

#### 4.4.1 Das rezeptive Feld (RF) der kortikalen Kolumne

Die Neurone eines Barrels reagieren bevorzugt auf die Stimulation der entsprechenden somatotopen Vibrisse (Armstrong-James, 1975; Simons, 1978; Ito, 1985; Armstrong-James et al., 1991; Armstrong-James und Callahan, 1991; Armstrong-James et al., 1992; Welker et al., 1993). Sie besitzen somit ein gemeinsames RF, das aus einer einzelnen Vibrisse besteht. Die morphologische Grundlage liefern die VPM Terminalen der thalamokortikalen Afferenzen, die fast ausschließlich innerhalb der topographisch entsprechenden Barrel-Kolumne lokalisiert sind. Die Axonkollaterale dieser Fasern bilden in Lamina 4 Cluster, die die Barrelgrenzen nicht überschreiten (Bernardo und Woolsey, 1987; Jensen und Killackey, 1987). Die Eigenschaft bevorzugt auf die Stimulation der somatotopen Vibrisse zu antworten, ist nicht nur auf die Barrel in L4 beschränkt, sondern gilt für die gesamte Kolumne (Armstrong-James et al., 1992; Simons et al., 1992). Neurone, deren RFs aus derselben Einzelvibrisse besteht, findet man in allen Laminae der Barrel-Kolumne, obwohl die Terminalen der thalamokortikalen Afferenzen hauptsächlich in L4 und in geringerem Maße an der Grenze zwischen Lamina 5 und 6 lokalisiert sind. Erklärbar ist dies einerseits dadurch, dass die TKA in Lamina 4 an den apikalen Dendriten der infragranulären Laminae und den basalen Dendriten der supragranulären Laminae Synapsen bilden (Hersch und White, 1981a, b, c; Keller und White, 1989). So können Neurone, unabhängig in welcher Lamina ihre Somata lokalisiert sind, direkte Eingänge aus dem Thalamus erhalten. Intrakortikale Mechanismen sind andererseits für die Erhaltung der RF Eigenschaften innerhalb der gesamten vertikalen Barrel-Kolumne verantwortlich. Eine Grundlage hierfür bieten die mittels Photostimulation nachgewiesenen L4 → L2/3 Projektionen, die rein vertikal orientiert sind und nur intrakolumnär verlaufen, ebenso wie die überwiegend intrakolumnären L4 → L5 Projektionen (siehe Kapitel 4.4.3). Für die kolumnäre Übertragung sensorischer Information von L4 nach L2/3 spricht ebenfalls, dass das IOS nach Stimulation der L4 Barrels innerhalb der Barrel-Kolumne vertikal von L4 nach L2/3 weitergeleitet wird. Kolumnär organisierte L4 → L2/3 Projektionen, die durch anatomische Studien gut belegt sind (Bernardo et al., 1990a, b; Feldmeyer et al., 1999a,b; Feldmeyer und Sakmann, 2000; Lübke et al., 2000; Petersen und Sakmann, 2000; Feldmeyer et al., 2002), können somit die in L4 eingehenden sensorische Information an supragranuläre Laminae derselben Kolumne weiterleiten und stellen somit die erste intrakortikale Relaisstation für sensorische Information dar. Für diese sequentielle, kolumnäre Verarbeitung spricht ebenso dass L2/3 Neurone, die bevorzugt auf Stimulation der topographisch zugeordneten Vibrisse bzw. des thalamischen Barreloids antworten, im Vergleich zu L4 Neuronen längere Latenzzeiten und geringere Antwortamplituden zeigen (Carvell und Simons, 1988; Agmon und Connors, 1992; Armstrong-James et al., 1992; Welker et al., 1993).

Neben diesem sequentiellen Verarbeitungsmodus besteht weiterhin die Möglichkeit, dass L2/3 Neurone über ihre basalen Dendriten direkt Eingänge aus dem Thalamus erhalten. Die Amplitude dieser EPSPs ist jedoch zu klein, um APs auszulösen (unterschwellige EPSPs). Aus diesem Grund müssen sie sich zu exzitatorischen Eingängen anderer thalamisch aktivierter L4 Neuronen addieren können. So ergibt sich in

supragranulären Laminae erst zeitverzögert eine überschwellige Antwort auf die Stimulation der somatotop repräsentierten Vibrisse.

#### **4.4.2 Die Barrels der Lamina 4 als unabhängige, kolumnäre Untereinheit**

L4 stellt das Hauptziel sensorischer Eingänge innerhalb des Kortex dar. Die thalamokortikalen Afferenzen des VPM enden gruppiert im topographisch entsprechenden Barrel und projizieren selten über dessen Grenzen hinaus. Durch diesen gruppierten Eingang der sensorischen Information in den Barrel-Kortex, wird jedes Barrel, weitgehend unabhängig vom benachbarten Barrel bzw. der benachbarten Barrel-Kolumne, von subkortikalen Neuronen erregt. Die sensorische Information geht jedoch nicht nur kolumnär im Barrel-Kortex ein, sondern wird auch kolumnär weiterverarbeitet und übertragen. Dies spiegelt sich auch in der Organisation der Dendriten und der Axonkollateralen der L4 Neurone wider. Exzitatorische Stern- und Sternpyramidenzellen bilden die Ziele thalamokortikaler Afferenzen (McCormick, 1992; Sherman und Guillery, 1996; Feldmeyer et al., 1999a). Ihre dendritischen Verzweigungen sind, mit Ausnahme der apikalen Dendriten der Sternpyramidenzellen, auf das Barrel, in dem auch ihre Somata liegen, beschränkt (Harris und Woolsey, 1981; Simons und Woolsey, 1984; Feldmeyer und Sakmann, 2000; Petersen und Sakmann, 2000; Lübke et al., 2000, 2002). Die vertikal orientierten Axone beider Neuronentypen durchlaufen zwar alle Laminae, enden jedoch überwiegend in L4 und L2/3. Sie bilden fast ausschließlich Synapsen am dendritischen Schaft oder an dendritischen Dornfortsätzen exzitatorischer Neurone aus (Feldmeyer und Sakmann, 2000; Petersen und Sakmann, 2000; Lübke et al., 2000, 2002).

Das intralaminäre Netzwerk der L4 Barrels macht diese nicht nur zu anatomisch, sondern auch zu von benachbarten Barrels funktionell unabhängigen Einheiten, die die afferenten Eingänge parallel verarbeiten. Eine horizontale Weiterleitung von sensorischer Information von Barrel zu Barrel konnte weder durch die vorliegenden Daten noch durch andere Studien nachgewiesen werden (Feldmeyer und Sakmann, 2000; Laaris et al., 2000; Petersen und Sakmann, 2000, 2001; Lübke et al., 2000, 2002). Wie durch das IOS dargestellt werden konnte, löste die elektrische Stimulation der L4 Barrels eine Aktivierung des gesamten stimulierten Barrels aus. Die neuronale Aktivität griff jedoch nicht auf benachbarte Barrels über. Bei Verwendung einer geringen Stimulationsintensität war die neuronale Erregung auf die Barrel-Höhle beschränkt, ohne auf andere Laminae überzugreifen. Unterschiede in der Lokalisation der Stimulationselektrode (Barrelhöhle bzw. -seite) wirkten sich nicht auf das evozierte Erregungsmuster aus. Auch eine Stimulation der Barrelseite führte lediglich zur Aktivierung der angrenzenden Barrels. Dieses Ergebnis liefert einen starken Hinweis darauf, dass L4 Barrels ein unabhängiges neuronales Netzwerk ausbilden. Studien, in denen spannungsabhängige Farbstoffe verwendet wurden und die Barrel-Höhlen ausschließlich im Zentrum stimuliert wurden, stützen diesen Befund (Petersen und Sakmann, 2001; Laaris und Keller, 2002). Eine horizontale Weiterleitung sensorischer Information von Barrel zu Barrel konnte hierbei ebenfalls nicht beobachtet werden.

Die neuronale Aktivität von L4 Neuronen wird somit hauptsächlich durch thalamokortikale Eingänge sowie durch Interaktionen zwischen im Barrel lokalisierten Neuronen bestimmt. Die aus mehreren Vibrissen bestehenden RFs (multiRF) in L4 sind dementsprechend nicht auf die Interaktion mehrerer Barrels zurückzuführen. Die Eigenschaften der multiRF der Barrels entstehen durch die, von mehreren Vibrissen generierten, thalamischen Eingänge homologer Barreloide (Simons und Carvell, 1989; Brumberg et al., 1996) und/oder durch Eingänge nicht-homologer, benachbarter Barreloide (Land und Simons, 1985a; Land et al., 1995; Arnold et al., 2001). Die Integration der sensorischen Information mehrerer Vibrissen erfolgt somit schon auf subkortikalen Ebenen (Simons und Carvell, 1989; Armstrong-James und Callahan, 1991;

Diamond et al., 1992a, b). Lokale exzitatorische und inhibitorische Verschaltungen innerhalb einzelner L4 Barrels verarbeiten die Eingänge mehrerer Vibrissen vielmehr dahingehend, dass aufgrund einer Selektion überwiegend Information bezüglich einer einzelnen Vibrisse an andere Laminae weitergeleitet wird (Goldreich et al., 1999; Feldmeyer und Sakmann, 2000; Lübke et al., 2000). Dadurch wird eine höhere Trennschärfe der räumlichen Information erreicht. Das exzitatorische intralaminäre Netzwerk der L4 Neurone bietet außerdem die Möglichkeit schwache thalamokortikale Eingänge zu amplifizieren und deren Weiterleitung an supragranuläre Laminae zu gewährleisten (Stratford et al., 1996; Feldmeyer und Sakmann, 2000; Lübke et al., 2000).

Sensorische Information, die aus der Peripherie eingeht, wird nicht nur innerhalb der L4 Barrels verarbeitet, sondern auch an supragranuläre Laminae weitergeleitet. Diese L4 → L2/3 Projektionen wurden durch intrazelluläre Färbungen nachgewiesen (Feldmeyer und Sakmann, 2000; Petersen und Sakmann, 2000; Lübke et al., 2000, 2002). Auch die vorliegenden Daten belegen die überwiegend kolumnär organisierten, vertikalen Projektionen zu L2/3 Neuronen. L2/3 Neurone, die über den Barrel-Seiten lokalisiert sind, erhalten die meisten synaptischen Eingänge aus L4 aus der direkt darunter liegenden Barrel-Seite und den angrenzenden Barrel-Höhlen. Das IOS neuronaler Aktivität liefert für die vertikale, intrakolumnäre Organisation der L4 → L2/3 Projektionen einen weiteren Beleg. Nach starker elektrischer Stimulation der L4 Barrels breitete sich das IOS innerhalb der Barrel-Kolumne von L4 in die supragranulären Laminae aus. Studien mit spannungsabhängigen Farbstoffen („voltage-sensitive dyes“, VSD) liefern ein nahezu identisches Erregungsmuster nach Stimulation der L4 Barrels (Laaris und Keller, 2002; Petersen und Sakmann, 2001). Innerhalb der supragranulären Laminae breitet sich das VSD Signal jedoch nur geringfügig über die Grenzen der Barrel-Kolumne aus. Diese interkolumnäre Weiterleitung neuronaler Aktivität ist im IOS erst nach Stimulation der supragranulären Laminae zu beobachten, die vor allem durch Neurone der L2/3 vermittelt wird (siehe Kapitel 4.5.1). Dieser Unterschied zu den oben genannten Studien könnte auf Unterschiede zwischen dem IOS und dem VSD-Signal zurückgeführt werden. Spannungsabhängige Farbstoffe geben direkt die Potentialänderung neuronaler Strukturen wider. Dies erfolgt beim IOS auf indirektem Wege über eine Volumenänderung der Glia bzw. des Extrazellulärraums. Mittels intrazellulärer Färbungen als auch durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Kartierung neuronaler Konnektivität, konnten einige wenige L4 Axone nachgewiesen werden, die in L2/3 über die Barrel-Kolumne hinaus projizieren (Feldmeyer und Sakmann, 2000; Lübke et al., 2000; Petersen und Sakmann, 2001). Diese Verbindungen machen jedoch im Gegensatz zu den intrakolumnären L4 → L2/3 Projektionen einen verschwindend geringen Anteil aus. Die Barrel-Kolumne spiegelt sich somit nicht nur als funktionelle und anatomische Manifestation in Form der Barrels wider, sondern auch in der kolumnären Weiterleitung sensorischer Information.

## **4.5 L4 → L5 Projektionen - Kolumnäre Weiterleitung sensorischer Information?**

Die sensorische Information wird ausgehend von den L4 Neuronen, dem Hauptziel der thalamokortikalen Afferenzen, nicht nur an die supragranulären Laminae weitergeleitet, sondern auch nach basal an infragranuläre Laminae. Die Eigenschaft überwiegend auf die Stimulation der somatotopen Vibrisse zu antworten, ist dementsprechend nicht auf die L4 Barrels und die darüber liegenden Bereiche der supragranulären Laminae beschränkt, sondern gilt für die gesamte Kolumne, d.h. auch für die infragranulären Laminae (Armstrong-James et al., 1992; Simons et al., 1992). Die Weiterleitung neuronaler Erregung von L4 nach L5 wird über die mittels IR-gelenkter Photostimulation nachgewiesenen L4 → L5 Projektionen vermittelt. Wie auch durch anatomische Studien

belegt, sind diese Verbindungen relativ selten (Callaway und Wiser, 1996; Lübke et al., 2000).

Die sequentielle Weiterleitung von sensorischer Information durch L4 → L5 Projektionen ist nicht ausschließlich kolumnär organisiert. Sowohl die vorliegenden Daten als auch andere Arbeiten (Lübke et al., 2000; Schubert et al., 2001) belegen, dass ein kleiner Teil der L4 → L5 Projektionen aus benachbarten Barrel-Kolumnen stammt. Außerdem zeigen weder die Latenzzeit noch die Amplitude der Antworten von L5 Neurone signifikante Unterschiede, wenn die somatotop entsprechende Vibrisse im Vergleich zur benachbarten Vibrisse stimuliert wird (im Gegensatz zu L2/3 und L4 Neuronen) (Armstrong-James et al., 1992). Diese Befunde sprechen dafür, dass sensorische Information von L4 nicht nur innerhalb einer Kolumne an L5, sondern simultan an mehrere L5 Barrel-Kolumnen weitergeleitet wird. In L5 enden zudem thalamokortikale Afferenzen, durch die direkt sensorische Information subkortikaler Regionen übertragen wird.

Weiterhin charakteristisch für die L4 → L5 Projektionen ist, dass deren präsynaptische Neurone ausschließlich in den L4 Barrelseiten lokalisiert sind. Die Zelldichte in den Seitenbereichen der Barrels ist höher als in den Barrel-Höhlen. Daher ist es wahrscheinlicher in den Seitenbereichen eine auf L5 Pyramidenneuronen projizierende Zelle nachzuweisen. Da die Barrel-Höhlen aber nicht zellfrei sind, würde man einige wenige Projektionen von dort nach L5 erwarten. Solche Projektionen konnten jedoch nicht gefunden werden. Dieser Befund spricht nicht nur für eine anatomische, sondern auch für eine funktionelle Gruppierung der auf L5 projizierenden Barrelneurone in den Seitenbereichen der Barrels. Die anatomisch gruppierten exzitatorischen Sternzellen von L4 weisen zusätzlich eine hohe Verbindungswahrscheinlichkeit auf (Feldmeyer et al., 1999; Lübke et al., 2000), so dass die gebündelten L4 → L5 Projektionen wahrscheinlich von synaptisch gekoppelten Neuronengruppen ausgehen. Nicht nur die L4 → L5 Projektionen zeigen, dass die Barrels bezüglich ihrer synaptischen Ein- und Ausgänge eine funktionelle Unterteilung aufweisen. Thalamische Projektionen des P0m enden in den Barrel-Seiten, Projektionen des VPM dagegen komplementär dazu in den Barrel-Höhlen (Diamond et al., 1992a; Lu und Lin, 1993). Neurone der Barrel-Seiten zeigen im Vergleich zu Neuronen der Barrel-Höhlen eine geringere zeitliche und räumliche Auflösung nach der Stimulation einer Vibrisse. Sie scheinen somit die neuronale Aktivität über mehrer Bewegungszyklen der Vibrissen bzw. über mehrere simultan stimulierte Vibrissen zu integrieren (Brecht und Sakmann, 2002). Ganz im Gegensatz zu den äußerst seltenen Projektionen zwischen Barrels (siehe Kapitel 4.4.2), sind Projektionen innerhalb der Barrel-Seiten, die diese intensiv miteinander verschalten, sehr häufig (Chapin et al., 1987; Höflinger, 1995). Zudem ist die Spontanaktivität der L4 Neurone der Barrel-Seiten niedriger als die der L4 Barrel-Höhlen. Sie scheinen daher ein Netzwerk darzustellen, das unter geringerer inhibitorischer Kontrolle steht (Kim und Ebner, 1992; Brumberg et al., 1996).

## 4.6 Horizontale Verschaltungen mehrerer Kolumnen

Eine Aufgabe des Barrelkortex ist es, die Information mehrerer Vibrissen auszuwerten. Um die Form eines Objektes zu erfassen, wird die somatosensorische Information über die Aktivierung einer Vibrisse im Kortex nicht separiert verarbeitet, sondern mit der Information benachbarter Vibrissen bzw. aller Vibrissen des Schnauzenbartes verrechnet (Moore et al., 1999). Folglich war es ein wichtiger Schritt nachzuweisen, dass die kortikalen Neurone der Barrel-Kolumne nicht nur auf die Stimulation der somatotop repräsentierten Vibrisse antworten, sondern auch auf die benachbarter Vibrissen (Chapin, 1986; Armstrong-James und Fox, 1987; Armstrong-James et al., 1992, 1993; Diamond et al., 1993). Die Antwort auf die Stimulation der Nachbarvibrissen erfolgt jedoch mit einer größeren zeitlichen Latenz und einer abgeschwächten Amplitude (Chapin, 1986; Armstrong-James und Fox, 1987). Die Möglichkeit, dass das über mehrere Vibrissen zeitlich und räumlich integrierte Signal durch intrakortikale Mechanismen entsteht, wurde

lange diskutiert (Armstrong-James und Callahan, 1991; Armstrong-James et al., 1992). Neuere Studien belegen jedoch, dass bereits die vom Thalamus in L4 eingehende sensorische Information sich auf mehrere Vibrissen bezieht (Moore und Nelson, 1998; Goldreich et al., 1999; Zhu und Connors, 1999; Brecht und Sakmann, 2000). Die Integration der sensorischen Information über mehrere benachbarte Vibrissen erfolgt somit schon auf subkortikaler Ebene. Im VPM wie auch im Trigeminalkomplex besitzen die Neurone rezeptive Felder, die sich über mehrere Vibrissen erstrecken (multiRF) (Simons und Carvell, 1989; Lichtenstein et al., 1990; Armstrong-James und Callahan, 1991; Brumberg et al., 1996). Diese Information über die Aktivierung mehrere Vibrissen wird vom homologen Barreloid des Thalamus an das entsprechende Barrel weitergegeben (Simons und Carvell, 1989; Brumberg et al., 1996). Zusätzlich erhalten die Barrels, wenn auch in geringem Ausmaß, konvergente Afferenzen nicht-homologer, benachbarter Barreloide (Land und Simons, 1985a; Land et al., 1995; Arnold et al., 2001). Die Interaktion mehrerer Barrel-Kolumnen ist somit keine zwingende Voraussetzung, um die Information mehrerer Vibrissen räumlich und zeitlich zu integrieren. Um jedoch RFs höherer Ordnung mit komplexerer Organisation aufzubauen, sind sowohl interlaminäre als auch interkolumnäre Verarbeitungsmechanismen erforderlich.

#### **4.6.1 Horizontale Weiterleitung der kolumnären Information durch supragranuläre Laminae**

Die sensorische Information wird von den L4 Barrels über einen „feed forward“ Mechanismus intrakolumnär an L2/3 weitergeleitet. Für die supragranulären Laminae ist eine starke intralaminäre Verknüpfung charakteristisch. Dies wurde anhand anatomischer und physiologischer Studien im somatosensorischen sowie im visuellen Kortex gezeigt (Burkhalter, 1998; Bernardo et al., 1990a, b; Höflinger et al., 1995; Nelson und Katz, 1995; Gottlieb und Keller, 1997). Anatomische Studien zeigen, dass die Neurone der supragranulären Laminae über lange, horizontal verlaufende Axonkollaterale verfügen (Burkhalter, 1998; Bernardo et al., 1990a, b; Höflinger et al., 1995; Gottlieb und Keller, 1997). Sie bilden die Grundlage für die horizontale Weiterleitung der neuronalen Erregung und ermöglichen so die Interaktion zwischen den verschiedenen Barrel-Kolumnen. Die in dieser Arbeit mittels Photostimulation nachgewiesenen L2/3 → L2/3 Projektionen ermöglichen es die horizontalen Verschaltungen der supragranulären Laminae detaillierter darzustellen. Da in 85% der Projektionen das präsynaptische Neuron innerhalb der angrenzenden Barrel-Kolumne lag, stellen die weitreichenden horizontalen L2/3 → L2/3 Projektionen nur einen kleinen Teil der intralaminären L2/3 Verbindungen dar. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen intrazellulärer Färbungen von Gottlieb und Keller (1997). Sie wiesen einige wenige Axonkollaterale von 600-2000 µm Länge nach, die 2-7 Barrel-Kolumnen umspannten. Die dichtesten Axonverzweigungen lagen jedoch innerhalb einer Barrel-Kolumne, in der auch das zugehörige Soma lokalisiert war. Dabei ist zu beachten, dass im Schnittpräparat die Wahrscheinlichkeit, einen axonalen oder dendritischen Fortsatz zu durchtrennen mit dessen Länge zunimmt. Dieser Effekt zeigt sich in einer kontinuierlichen Abnahme der Verbindungswahrscheinlichkeit. Die Anzahl der synaptischen L2/3 Verbindungen fällt jedoch an der Kolumnen-Grenze abrupt ab. Durch anatomischen Fasertrakt Färbungen werden weitreichende intralaminäre L2/3 Projektionen häufiger dargestellt als durch die vorliegende physiologische Kartierung (Burkhalter, 1998; Bernardo et al., 1990a, b; Höflinger et al., 1995). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass L2/3 Neurone innerhalb der supragranulären Laminae Synapsen an apikalen Dendriten granulärer und infragranulärer Pyramiden- bzw. Sternpyramidenzellen bilden. In axonalen Faserfärbungen würden diese Projektionen als intralaminär klassifiziert werden, durch die Kartierung der Somata mittels Photostimulation erscheinen sie jedoch als L2/3 → L4 bzw. L5 Projektionen. Die kolumnär übermittelte sensorische Information aus L4 wird dementsprechend über lokale synaptische Verbindungen überwiegend an direkt

benachbarte Barrel-Kolumne weitergegeben. In Gegensatz zu den intralaminären L4 Projektionen (siehe Kapitel 4.2.2) überschreiten die Projektionen von L2/3 die Grenzen der Barrel-Kolumne und ermöglichen so eine horizontale Weiterleitung neuronaler Erregung.

Dafür spricht auch die Form des IOS-Signals neuronaler Aktivität nach Stimulation von L2/3 (siehe Kapitel 3.4.2). Erfolgt die Stimulation zentral in einer Barrel-Höhle wird hauptsächlich die stimulierte L3 und L4 Barrel-Kolumne aktiviert. In L4 wird die Weiterleitung der neuronalen Erregung hingegen strikt durch die Barrel begrenzt. Der Grund dafür sind die kolumnär organisierten L4 → L2/3 Projektionen, die retrograd aktiviert wurden (siehe Kapitel 4.4.1 und 4.4.2). L2/3 → L4 Projektionen sind anatomische Studien zu Folge selten (Gilbert und Wiesel, 1983; Gottlieb und Keller, 1997; Staiger et al., 2000). In L2/3 selbst jedoch überschreitet das IOS, wenn auch nur geringfügig, d.h. mit den unerschwelligen Randbereichen, die Grenzen der Barrel-Kolumne. Diese Befunde, die für eine kolumnäre Interaktion im Grenzbereich der Barrel-Kolumnen in L3, nicht jedoch in L4 sprechen, werden durch vergleichbare Studien mit spannungsabhängigen Farbstoffen bestätigt (Petersen und Sakmann, 2001; Laaris und Keller, 2002) (siehe Kapitel 4.4.2). Das IOS, das sich durch die Stimulation von L2/3 über den Barrel-Seiten ergibt, liefert einen weiteren Beleg, dass in L2/3 die Information der benachbarten Barrel-Kolumnen integriert wird. Die Aktivierung erstreckt sich in diesem Fall über die beiden angrenzenden Barrel-Kolumnen ohne jedoch in L4 komplett zu verschmelzen. Die Organisation der basalen Dendriten der L2/3 Neurone passt in dieses Bild. Die Dendriten der L2/3 Neurone, die über einer Barrel-Seite lokalisiert sind, erstrecken sich über beide angrenzenden Barrel-Kolumnen. Sind die Neurone dagegen über einer Barrel-Höhle lokalisiert, überschreitet der Dendritenbaum die Grenzen der Barrel-Kolumne nicht (Gottlieb und Keller, 1997).

L2/3 → L2/3 Projektionen sind der oben gegebenen Erklärungen zu Folge überwiegend lokal innerhalb der Barrel-Kolumne organisiert. In einem geringeren Ausmaß jedoch überschreiten sie deren Grenzen und sorgen so für die Interaktionen zwischen den Barrel-Kolumnen. Die sensorische Information, die in L4 rein kolumnär verarbeitet wird, kann nach ihrer Weiterleitung an L2/3 intralaminär über mehrere benachbarte Barrel-Kolumnen integriert werden. Diese interkolumnären Projektionen bieten die Möglichkeit größere RFs mit komplexerer Organisation aufzubauen und somit die multi Vibrissen Information aus L4 weiter zu integrieren. Damit würden auch die im Vergleich zu L4 größeren RFs der supragranulären Laminae erklärt (Ito, 1985; Armstrong-James und Fox, 1987; Armstrong-James et al., 1991, 1992).

#### **4.6.2 Integration über mehrere Barrel-Kolumnen durch L5 Pyramidenneurone**

Im neokortikalen Netzwerk nehmen die L5 Pyramidenneurone eine besondere Stellung ein. Sie bekommen synaptische Eingänge sowohl aus allen Laminae, ausgenommen L1, sowie auch aus mehreren Kolumnen. Somit integrieren sie Informationen aus großen Kortexarealen, wofür sie ihre dendritische Organisation prädestiniert. L5 Pyramidenneurone sind charakterisiert durch ihre langen apikalen Dendriten, die bis in L1 reichen, wo sie sich schließlich in mehrere distale Dendriten aufzweigen (Larkman, 1991; Feldmeyer und Sakmann, 2000). Vom Soma der L5 Pyramidenneurone gehen neben dem apikalen mehrere basale Dendriten aus, die hauptsächlich horizontal orientiert sind (Ito, 1992; Gottlieb und Keller, 1997) und sich über 300µm erstrecken können. Die aktiven, regenerativen Leitfähigkeiten der Dendriten ermöglichen die Amplifikation distaler synaptischer Eingänge wie auch die supralineare Addition zeitlich koordinierter Eingänge aus verschiedenen Laminae (Stuart und Sakmann, 1995; Larkum et al., 1999; Zhu und Connors, 1999). L5 Pyramidenneuronen haben somit die Funktion neuronale Aktivität zu integrieren.

### 4.6.3 Periodische Organisation der L2/3 → L5 Projektionen

L5 Pyramidenneurone stellen als „Out-Put“-Neurone die letzte intrakortikale Schaltstation der in den Kortex eingehenden, sensorischen Information dar. Physiologischen Studien zu Folge verläuft der kortikale Informationsfluss vor allem seriell von L4 nach L2/3 und von dort weiter nach L5 (Armstrong-James et al., 1992; Laaris et al., 2000). L2/3 → L5 Projektionen sind sowohl den vorliegenden Daten wie auch den Ergebnissen anderer Studien entsprechend die häufigsten exzitatorischen interlaminären L5 Eingänge (Thomson und Deuchars, 1997; Thomson und Bannister, 1998; Reyes und Sakmann, 1999). Ihre Synapsen enden sowohl an den apikalen wie auch den weitreichenden basalen Dendriten der L5 Pyramidenneurone (Reyes und Sakmann, 1999; Feldmeyer und Sakmann, 2000), die mehrere Barrel-Kolumnen umspannen. Diese Dendritenstruktur (siehe Kapitel 4.5.2) wie auch die horizontalen Projektionen der supragranulären Laminae ermöglichen es, die synaptischen Eingänge der supragranulären Laminae über mehrere Barrel-Kolumnen zu integrieren. Ersichtlich wird dies durch die L2/3 → L5 Projektionen, die nicht nur aus der direkt angrenzenden, ersten Barrel-Kolumne stammen, sondern auch aus der zweiten und dritten Barrel-Kolumne.

Anatomische wie physiologische Belege für L2/3 → L5 Projektionen sind zahlreich (Bernardo et al., 1990a, b; Gottlieb und Keller, 1997; Thomson und Deuchars, 1997; Thomson und Bannister, 1998; Reyes und Sakmann, 1999; Staiger et al., 2000; Schubert et al., 2001). Die hier beschriebene Periodizität dieser Projektionen mit zahlreichen Eingängen aus L2/3 Bereichen über den Barrel-Seiten und nur sehr wenigen Eingängen aus L2/3 Bereichen über den Barrel-Höhlen wurde jedoch durch keine der oben genannten Studien gezeigt. Die in dieser Arbeit nachgewiesene periodische Organisation der L2/3 → L5 Projektionen spricht dafür, dass die anatomische Struktur der Barrels zwar auf L4 beschränkt ist, sich jedoch in L2/3 funktionell widerspiegelt. Neurone, die auf L5 projizieren sind räumlich gruppiert und spezifisch über den Barrel-Seiten lokalisiert. Diese funktionelle Gruppierung von Neuronen der L2/3 an den Grenzen der Barrel-Kolumne spricht für die Hypothese, dass die Barrel-Kolumne nicht die kleinste vertikale Verarbeitungseinheit des Barrel-Kortex darstellt.

#### 4.6.3.1 Separate Verschaltung von zentralen und peripheren Bereichen der Barrel-Kolumne

Belege für die separate Informationsverarbeitung von Seiten und Höhlen der Barrels in L4 liefern sind zahlreich (siehe Kapitel 4.5). Die funktionelle Unterteilung der Barrel-Kolumne bezüglich ihrer synaptischen Verschaltungen in periphere und zentrale Bereiche ist jedoch nicht auf L4 beschränkt. Vorliegende Daten belegen eine funktionelle Gruppierung der auf L5 projizierenden L2/3 Neurone über den Barrel-Seiten. Diese Daten sprechen dafür, dass die Bereiche supra- und infragranulärer Laminae, die über oder unter den L4 Barrel-Seiten liegen, separate Verarbeitungseinheiten bilden, ohne ein anatomisches Korrelat zu lassen. Kortikothalamische Projektionen von L6 Neuronen, die unterhalb der Barrel-Seiten lokalisiert sind, enden sowohl im VPM wie auch im POM. L6 Neuronen, die unterhalb der Barrel-Höhlen lokalisiert sind, projizieren dagegen nur zum VPM (Chiaia, 1991). Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen L6 → L5 Projektionen weisen wie die L2/3 → L5 Projektionen eine leichte periodische Organisation auf. Neurone sowohl supra- wie auch infragranulärer Laminae, die in den peripheren Bereichen der Barrel-Kolumne lokalisiert sind, projizieren intrinsisch bevorzugt zu Bereichen, die über bzw. unter den Barrel-Seiten liegen und zwei bis drei Barrel-Kolumne entfernt sind. Neurone der zentralen supra- und infragranulären Bereiche der Barrel-Kolumne sind überwiegend intrakolumnär bzw. mit direkt angrenzenden Barrel-Kolumnen verschaltet ohne eine Differenzierung zwischen Seiten- und Zentralbereichen (Kim und Ebner, 1999).

Die dendritische Organisation der kortikalen Pyramidenneurone spricht ebenso für eine weitere Unterteilung der Barrel-Kolumne separate Module. Die apikalen Dendriten von L5

Pyramidenzellen bilden ascendierende Bündel und nehmen auf ihrem Weg zu oberflächlichen Schichten weitere apikale Dendriten von Neuronen supragranulärer Laminae auf (Escobar et al., 1986). Diese apikalen Dendritenbündel verlaufen bevorzugt in den Septen und Seiten der Barrels (Crandall et al., 1986; Escobar et al., 1986; Ito, 1992; White und Peters, 1993). Dies kommt einerseits durch die Häufung von deren Somata unter den Barreelseiten (Crandall et al., 1986), andererseits durch den gebündelten Verlauf der apikalen Dendriten zustande. Das führt zu der Annahme, dass die Neurone dieser Dendritenbündel und damit auch die Neurone der Seitenbereiche der Barrel-Kolumne zu funktionellen Verarbeitungsmodulen mit gemeinsamen synaptischen Eingängen und synchroner Aktivität zusammengeschaltet sind (Peters und Yilmaz, 1993; White und Peters, 1993). Dieses Organisationsprinzip lässt sich sowohl auf den Barrel-Kortex (White und Peters, 1993) wie auch auf andere somatosensorische Kortexareale anwenden (Peters und Sethares, 1991; Peters und Yilmaz, 1993). Die räumliche Überlappung der apikalen Dendritenbündel und der Barreelseiten begünstigt zudem die Funktion der Dendriten, die Information über mehrere angrenzende Barrel-Kolumnen horizontal zu integrieren. Unterschiedliche Verschaltungen von peripheren und zentralen Bereichen der Barrel-Kolumne liefert auch das IOS. Die Stimulation von L5 unterhalb einer Barrel-Seite liefert ein sanduhrförmiges IOS, das in L4 auf die Barrel-Seite eingengt ist. Die Stimulation unterhalb einer Barrel-Höhle dagegen markiert die gesamte Barrel-Kolumne. Farbstoffinjektionen in die entsprechenden L5 Bereiche liefern ein sehr ähnliches Muster angefärbter Fasertrakte (Bernardo et al., 1990a, b).

Ein weiteres Indiz für die funktionelle Untergliederung der Barrel-Kolumne liefern 2-Deoxyglukosestudien, die „Mini-Kolumnen“ mit erhöhter metabolischer Aktivität nachwiesen (McCashland und Woolsey, 1988). Diese Mini-Kolumnen erstrecken sich innerhalb der Barrel-Kolumne über alle Laminae und bilden ein Netzwerk aus eng verschalteten Neuronen. Erstmals erwähnt wurden die Mini-Kolumnen von Mountcastle (1957, zur Übersicht siehe Mountcastle, 1997) als physiologische Einheiten ähnlicher Antworteigenschaften, wie Rezeptorsubmodalität. Nissl-Färbungen ergaben ähnliche Durchmesser für die Mini-Kolumnen und Dendritenbündel im Bereich von 20-40  $\mu\text{m}$  (Rockel et al., 1980; Escobar et al., 1986).

#### 4.6.4 Intralaminäre L5 Projektionen

Zwischen L5 Pyramidenneuronen konnten intensive intralaminäre Verbindungen durch lange vertikale und horizontale Axonkollaterale, die sowohl an den apikalen als auch an den basalen Dendriten ankoppeln, nachgewiesen werden (Chagnac-Amitai et al., 1990; Thomson et al., 1993; Markram et al., 1997; Schubert et al., 2001). L5  $\rightarrow$  L5 Projektionen sind nicht nur die häufigste intralaminäre und intrakolumnäre Verbindung, sondern sie weisen auch die größte Reichweite auf. Damit sorgen sie einerseits für eine intensive lokale Verschaltung von Neuronen innerhalb derselben Lamina und Kolumne. Andererseits verbinden sie weit voneinander entfernt liegende Neurone verschiedener Laminae und Kolumnen. L5 Pyramidenneurone bilden typischerweise primäre Axone in der nahen Umgebung ihres Somas sowie sekundäre Axone in größerer Entfernung (Gilbert und Wiesel, 1983). Das Ausbreitungsgebiet der primären Axonkollaterale hat einen ungefähren Durchmesser von 300 $\mu\text{m}$ , der dem Durchmesser einer kortikalen Kolumne entspricht (Szentágothia, 1975). Etwa 10% der lokalen L5 Pyramidenneurone sind über 4-8 Synapsen miteinander verbunden (Markram et al., 1997).

L5  $\rightarrow$  L5 Projektionen sind die häufigste interkolumnäre Verbindung und damit für Integration intrakortikaler Information über mehrere Kolumnen am bedeutendsten. Die Konvergenz synaptischer Eingänge ist in dieser Lamina am größten. Die schon eingehend beschriebene dendritische Organisation der L5 Pyramidenneurone (siehe Kapitel 4.5.2) liefert dafür die anatomischen Voraussetzungen. Ein Resultat dieser Konvergenz ist das RF in L5 nach Stimulation einer Vibrisse, das im Vergleich zum RF in L4 oder in den supragranulären Laminae eine maximale räumliche Ausdehnung hat und 12 oder mehr Vibrissen umfassen kann (Simons, 1978; Ito, 1985).

Im Gegensatz zu den L2/3 → L5 Projektionen sind die L5 → L5 Projektionen nicht gruppiert und weisen keine Periodizität auf. In anatomischen Studien werden intralaminäre L5 Projektionen im Vergleich zu L5 → L2/3 Projektionen ebenso als diffuser bezeichnet (Callaway und Wiser, 1996; Gottlieb und Keller, 1997). L5 → L5 Projektionen werden seltener je größer der Abstand zwischen den verbundenen Neuronen ist. Erklärbar ist dies u.a. durch die größere Wahrscheinlichkeit Faserverbindungen durch die Schnittpräparation zu durchtrennen.

#### 4.6.5 Rückkopplungsmechanismen der L5 Neurone

Supra- und infragranuläre Laminae sind nicht nur deszendierend miteinander verschaltet, sondern weisen intensive reziproke Verbindungen auf (Bernardo et al., 1990). Die auch durch IR-gelenkte Photostimulation nachgewiesenen L5 → L2/3 Projektionen kommen vermehrt innerhalb einer Barrel-Kolumne vor, ohne jedoch die strikt kolumnäre Organisation der L4 → L2/3 oder L2/3 → L2/3 Projektionen aufzuweisen. Durch diese positive Rückkopplung der L5 Pyramidenneurone zu supragranulären Laminae könnten die Antwortschwellen der L2/3 Neurone für zeitlich nachfolgende Stimuli vor allem innerhalb der Barrel-Kolumne sowie in geringerem Ausmaß in den benachbarten Kolumnen gesenkt werden.

Das RF in den supragranulären Laminae nach Stimulation einer Vibrisse ist im Vergleich zu L4 größer (Simon et al., 1984; Ito, 1985). Dieses Ergebnis reflektiert nicht nur die horizontale Weiterleitung der sensorischen Information innerhalb dieser Laminae, sondern auch die enge intrakortikale Verknüpfungen mittels Vorwärts- und Rückprojektionen.

### 4.7 Die Beteiligung von NMDA- und nicht-NMDA-Rezeptoren an den intrakortikalen Verschaltungen des Barrel-Kortex

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des Barrel-Kortex. Die Hauptkomponente der mittels Photostimulation evozierten intrakortikalen EPSPs wird durch nicht-NMDA-Rezeptoren vermittelt. Der traditionellen Sichtweise entsprechend wird den NMDA-Rezeptoren eine besondere Bedeutung für die Ausbildung neuronaler Plastizität zugeschrieben. In der Übertragung neuronaler Erregung spielen sie jedoch nur eine untergeordnete Rolle (Collingridge und Bliss, 1987). *In vitro* Studien im Neokortex bestätigten diese Annahme (Artola und Singer, 1987, 1990; Sutor und Hablitz, 1989). NMDA-Rezeptor vermittelte EPSPs können im somatosensorischen Kortex nach Zugabe von GABA-Rezeptor-Antagonisten, die die Inhibition herabsetzen, nachgewiesen werden (Artola und Singer, 1987, 1990). Eine entsprechende Wahl der Stimulusintensität (Sutor und Hablitz, 1989) oder die Verwendung von magnesiumfreier Extrazellulärlösung (Thomson et al., 1985; Thomson, 1986; Hüttner und Baughmann, 1988) kann jedoch eine Aktivierung der NMDA-Rezeptoren bewirken. Hierbei wird die spannungsabhängige Blockade der NMDA-Rezeptoren durch  $Mg^{2+}$ -Ionen verhindert (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). In der vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren bei der Übertragung intrakortikaler Information in einigen Fällen nachgewiesen werden ohne derartige Modifikationen der Versuchsbedingungen vornehmen zu müssen. Die mittels Photostimulation evozierten monosynaptischen EPSPs der L5 Pyramidenneurone ebenso wie das IOS zeigten eine durch D-APV blockierbare NMDA-Rezeptor abhängige Komponente. EPSPs der L2/3 Pyramidenneurone hingegen zeigten keine NMDA-Rezeptor-Komponente. Dies kann durch ihr negatives Ruhemembranpotential erklärt werden. Das IOS, das durch elektrische Stimulation supragranulärer Laminae evoziert wurde, ist mehr noch als das durch Stimulation von L5 ausgelöste IOS NMDA-Rezeptor abhängig. *In*

*in vivo* Studien zeigen ebenso, dass die NMDA-Rezeptoren nicht nur bei der Ausbildung neuronaler Plastizität, sondern auch bei der Übertragung sensorischer Information im Neokortex eine wichtige Rolle spielen. NMDA-Rezeptoren sind an der Entstehung von Aktionspotentialen maßgeblich beteiligt, die durch Stimulation der Vibrissen in L1 bis L4 ausgelöst werden (Armstrong-James et al., 1993). Die intrakortikale Informationsübertragung zwischen den Kolumnen kann durch D-APV beinahe völlig blockiert werden (Armstrong-James, 1991b). Auch in Hirnschnittpräparaten konnten zwischen gekoppelten Neuronen granulärer und supragranulärer Laminae gemischte EPSPs nachgewiesen werden, die durch NMDA- und nicht-NMDA-Rezeptoren vermittelt werden (Thomson et al., 1989; Kötter et al., 1998; Fukado et al., 1998; Feldmeyer et al., 2002). In den supragranulären Laminae wird die sensorische Information in horizontaler Richtung weitergeleitet. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren könnte der Amplifikation von nicht-NMDA-Rezeptor vermittelten Antworten dienen (Fox et al., 1990; Nishigori et al., 1990; Fukuda, 1998). Die gering ausgeprägte bzw. fehlende NMDA-Komponente der durch *in vitro* Studien nachgewiesenen intrakortikalen EPSPs kann auf die niedrigere Spontanaktivität dieser Neurone zurückgeführt werden. Im Schnittpräparat fehlen dem Neokortex alle aktiven sensorischen und modulatorischen Eingänge. Serotonerge, cholinerge und noradrenerge ebenso wie glutamaterge Afferenzen, die einen depolarisierenden Einfluss auf die kortikalen Neurone ausüben, sind zum großen Teil durchtrennt (Armstrong-James und Fox, 1983; Fox und Armstrong-James, 1986; Sato et al., 1987; Armstrong-James und Fox, 1988). *In vivo* regulieren sie Stärke und Muster der Spontanaktivität, ebenso wie das Ruhemembranpotential kortikaler Pyramidenneurone. Somit liegt das Ruhemembranpotential in *in vivo* Präparaten verglichen mit Hirnschnittpräparaten näher an der AP-Schwelle (Connors et al., 1982). *In vivo* führt der depolarisierende Einfluss kortikaler Afferenzen zu einer Aktivierung der spannungsabhängigen NMDA-Rezeptoren. Ein weiterer Grund für die niedrige NMDA-Rezeptor Aktivität *in vitro* ist eine stärkere Inhibition in neokortikalen Schnittpräparaten im Vergleich zu *in vivo* Präparaten.

## 4.8 Inhibition im Barrel-Kortex

Die Mehrheit der neuronalen Verbindungen im Kortex ist exzitatorisch. IPSPs werden, im Gegensatz zu EPSPs, mittels Photostimulation nur sehr selten ausgelöst. Dies kann einerseits dadurch erklärt werden, dass sowohl in den supra- als auch in den infragranulären Laminae die exzitatorischen Pyramidenneurone den häufigsten Zelltyp darstellen (Gilbert und Wiesel, 1979; Callaway und Wiser, 1996; Gottlieb und Keller, 1997). Entsprechende Untersuchungen ergaben, dass 75% der neokortikalen Neurone glutamaterg sind. Nur 25% der Neurone sind GABAerg und üben einen inhibitorischen Einfluss auf ihre postsynaptischen Zielgebiete aus (Conti et al., 1987; Hendry et al., 1988; Jones et al., 1993). Das Verhältnis von asymmetrischen (vermutlich exzitatorisch) zu symmetrischen Synapsen im Neuropil der Barrels liegt bei 93% zu 7% (Peters et al., 1991). Trotz ihrer geringen Anzahl sind inhibitorische Synapsen äußerst effektiv, da sie zum Beispiel an Verzweigungsstellen des Dendritenbaumes und am Axonhügel auf das postsynaptische Neuron verschalten. Hierdurch haben sie einen erheblichen Einfluss auf die Integration exzitatorischer Eingänge (Keller und White, 1989; Holmes, 1992). Ein weiterer Grund dafür, dass GABA<sub>A</sub>-vermittelte IPSPs im Vergleich zu EPSPs nur selten beobachtet werden konnten, ist das Umkehrpotential der sie vermittelnden Cl<sup>-</sup>-Ionen. Es liegt mit etwa -68mV nahe am Ruhemembranpotential der abgeleiteten Pyramidenneurone (Benardo, 1994).

Physiologische Studien belegen, dass während der frühen postnatalen Entwicklung, sowie auch im adulten Kortex die Ausschüttung von GABA nicht zur Hyperpolarisation, sondern zur Depolarisation kortikaler Neurone und zum Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt (Luhmann und Prince, 1991; Yuste und Katz, 1991; LoTurco et al., 1995; Gullledge und Stuart, 2003). Dies ist auf eine höhere Konzentration von Cl<sup>-</sup>-Ionen

im intrazellulären im Vergleich zum extrazellulären Raum zurückzuführen (zur Übersicht siehe Ben-Ari, 2002). Die verzögerte Differenzierung der GABA-Rezeptor-vermittelten Inhibition führt somit zu einer vorherrschenden Glutamat-Rezeptor-vermittelten Aktivität (Kriegstein et al., 1987). Diese spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität der synaptischen Verbindungen und deren Plastizität (Crair und Malenka, 1995).

Ein stabiles Gleichgewicht zwischen Inhibition und Exzitation verhindert im Neokortex epileptische Aktivität (zur Übersicht siehe Tasker und Dudek, 1991). Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die horizontale Weiterleitung sensorischer Information und die Interaktionen benachbarter Kolumnen durch GABAerge Interneurone reguliert werden (Chagnac-Amitai und Connors, 1989; Ebner und Armstrong-James, 1990). In der vorliegenden Arbeit wird dies durch die IOS Experimente belegt. Nach Zugabe des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten Picrotoxin war die neuronale Aktivität nicht mehr auf eine Barrel-Kolumne beschränkt, sondern breitete sich lateral über mehrere Barrel-Kolumnen aus. Die anatomischen Voraussetzungen hierfür werden durch inhibitorische Interneurone der supragranulären Laminae gegeben, deren Axonkollaterale sich wenigsten über die benachbarten Barrel-Kolumnen erstrecken (Welker et al., 1993). Diese GABAerg regulierte horizontale Weiterleitung ist jedoch auf L2/3 beschränkt und weder in L4 noch in L5 zu beobachten. Die Inhibition der Barrels dient nicht dazu, die vom Thalamus in L4 eingehende neuronale Erregung, lateral zu beschränken. Durch entsprechende Versuche mit spannungsabhängigen Farbstoffen wurde bestätigt, dass Interaktionen benachbarter Barrels nicht durch GABA-vermittelte Mechanismen blockiert werden (Petersen und Sakmann, 2001; Laaris und Keller, 2002). In L4 werden GABAerge Interneurone direkt über „feed forward“ Mechanismen thalamischer Eingänge aktiviert und dienen dazu, als Netzwerk innerhalb eines Barrels die Antworten der Barrelneurone und die Reizsubmodalitäten zu korrelieren, sowie die Größe des rezeptiven Feldes zu modulieren (Simons und Carvell, 1989; Kyriazi und Simons, 1993; Brumberg et al., 1996; Kyriazi et al., 1996a, b).

## 4.9 Neuronale Plastizität synaptischer Verschaltungen im Barrel-Kortex

Die sensorische Aktivierung des Barrel-Kortex durch Stimulation der Vibrissen beeinflusst die Entwicklung der intrakortikalen, synaptischen Verschaltungen maßgeblich. Durch sensorische Deprivation wird die in den Kortex eingehende Information stark reduziert. Daraus resultieren ein modifiziertes Verschaltungsmuster der Neurone sowie eine Reduktion der synaptischen Übertragungsstärke bzw. Kopplung.

### 4.9.1 Methode der sensorischen Deprivation

Die sensorische Deprivation stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe sensorische aktivitätsabhängige Plastizität im Barrel-Kortex ausgelöst und analysiert werden kann. Durch das Abschneiden der Vibrissen wird die Aktivierung der Neurone des sensorischen Übertragungsweges stark reduziert. Im Gegensatz zur Denervation des *Nervus infraorbitalis* bzw. zur Läsionierung der Vibrissenfollikel ist die sensorische Deprivation eine nicht invasive Manipulation sensorischer Eingänge. Weder sensorische Rezeptoren noch die Neurone und Afferenzen des sensorischen Übertragungsweges werden zerstört. Sekundäre Effekte aufgrund neuronalen Zelltods werden somit vermieden. Die Übertragung humoraler Faktoren, wie Neurotransmitter, -modulatoren und Neurotrophine, ist weiterhin möglich.

Durch das uniforme Abschneiden aller Vibrissen der zum untersuchten Barrel-Kortex kontralateralen Seite, herrscht ein Gleichgewicht in der Aktivierung der sensorischen Eingänge. Konkurrierende Interaktionen zwischen den Barrel-Kolumnen oder den sensorischen Afferenzen können somit nicht entstehen.

## 4.9.2 Lokalisation neuronaler Plastizität

Um sekundäre, plastische Effekte im Barrel-Kortex durch plastische Veränderungen auf subkortikaler und thalamokortikaler Ebene zu vermeiden, wurde mit der Deprivation erst ab dem postnatalen Tag (PND) 9 begonnen. Die somatotopen Strukturen des Trigeminalkomplexes und des Thalamus werden schon während embryonaler Phasen ausgebildet (Durham und Woolsey, 1984; Chiaia et al., 1992a, b). Thalamokortikale Afferenzen wachsen zwischen PND 0 und PND 4 in den Barrel-Kortex ein (Erzurumlu und Jhaveri, 1990; Senft und Woolsey, 1991a, b). Zudem sind die sensorischen Antworten nach Stimulation einer deprivierten und nicht deprivierten Vibrisse im Trigeminalkomplex und im Thalamus nicht zu unterscheiden (Glazewski et al., 1998a, b; Wallace und Fox, 1999). Plastische Veränderungen aufgrund sensorischer Deprivation spiegeln sich somit als direkte Effekte auf kortikaler Ebene wider.

Zwischen PND 10 und 15, dem Zeitraum der Deprivation, entwickeln sich die Mehrheit der intrakortikalen Synapsen und damit der intrakortikalen Verschaltungen (Micheva und Beaulieu, 1996; Klintsova und Greenough, 1999; Zito und Svoboda, 2002). Durch den Zeitpunkt und die Art der Deprivation wird zudem die aktivitätsunabhängige Veränderung der Barreilmorphologie vermieden (Weller und Johnson 1975; Woolsey und Wann, 1976; Kossut, 1985). Die Barrels dienen somit als somatotopes Raster, anhand dessen plastische Veränderungen funktioneller Verbindungen detektiert werden können.

## 4.9.3 Plastische Effekte sensorischer Deprivation

### 4.9.3.1 Plastizität der Ausprägung kortikaler Antworten

Durch sensorische Deprivation wird die Aktivität im Barrel-Kortex bis auf das Niveau der Spontanaktivität reduziert. Infolge dessen wird die Amplitude der mittels Laserstimulation evozierten EPSPs von L5 Pyramidenneuronen durch die Deprivation verringert. Begründet werden kann dies einerseits durch eine Reduktion der Anzahl funktioneller Synapsen zwischen dem stimulierten, präsynaptischen und dem abgeleiteten, postsynaptischen Neuron. Durch sensorische Deprivation wird zwar die Neubildung von Synapsen reduziert, nicht jedoch die Anzahl der bestehenden Synapsen (Fox, 1996; Veas et al., 1998; Lendvai et al., 2000; Sadaka et al., 2000) (siehe Kapitel 4.9.4). Andererseits kann die Effizienz der synaptischen Übertragung durch Deprivation herabgesetzt werden und somit für die Reduktion der EPSP-Amplitude verantwortlich gemacht werden (siehe Kapitel 4.9.4).

Analog dazu werden Antworten von Neuronen des Barrel-Kortex, die durch Stimulation der Vibrissen ausgelöst werden, abgeschwächt (Glazewski et al., 1998a, b; Lendvai et al., 2000). Durch Stimulation der somatotop entsprechenden Vibrisse werden Antworten hoher Amplitude evoziert, durch Stimulation der benachbarten Vibrissen dagegen Antworten niedriger Amplitude. Sensorische Deprivation am Ende der zweiten postnatalen Woche reduziert die Amplitude der Antwort auf Stimulation der somatotopen Vibrisse. Zudem erhöht sich die Amplitude der Antworten nach Stimulation der umgebenden Vibrissen. Diese Reduktion bzw. Potenzierung der neuronalen Antwort auf sensorische Stimulation ist ein aktivitätsabhängiger Prozess, da sie durch Blockade postsynaptischer Aktivität mittels Applikation eines GABA<sub>A</sub>-Agonisten (Muscimol) im Kortex verhindert wird (Wallace et al., 2001).

Deprivationsparadigmen, die einzelne Vibrissen aussparen, führen im Vergleich zur der in dieser Arbeit angewandten, uniformen Deprivation aller Vibrissen zu einer stärkeren Abschwächung der neuronalen Antwort auf sensorische Stimulation (Glazewski et al., 1998a, b; Wallace und Fox, 1999a, b). Man spricht hier von „heterosynaptischer Depression“. Deprivierte, inaktive Eingänge werden hierbei durch nicht-deprivierte, aktive Eingänge gehemmt. Dieser Befund spricht dafür, dass der hetero- und

homosynaptische Depression zwei voneinander unabhängige Mechanismen zu Grunde liegen, die aktivitätsabhängig die kortikale Antwort abschwächen.

Bei den Experimenten dieser Arbeit wurden synaptisch gekoppelte Neuronenpaare als einzelne Komponenten neuronaler Netzwerke untersucht. Inhibitorische und exzitatorische Verbindungen konnten dadurch voneinander separiert werden. Die Verminderung der EPSP-Amplitude durch polysynaptische Inhibition kann somit ausgeschlossen werden. Es handelt sich bei der durch Deprivation aller Vibrissen ausgelösten, homosynaptischen Depression somit um einen aktiven Prozess.

#### 4.9.3.2 Plastizität neuronaler Kartierungen im Barrel-Kortex

Ein weiterer Effekt sensorischer Deprivation ist die Modifikation des Verteilungsmusters präsynaptischer Neurone durch sensorische Deprivation. Die periodische Organisation der L2/3 → L5 Projektionen mit mehr Eingängen aus den Wandbereichen der Barrel-Kolumnen und weniger Eingängen aus den zentralen Bereichen der Barrel-Kolumnen, spiegelt die Barrel-Struktur in L2/3 auf funktioneller Ebene wider. Durch Deprivation wird die vom Thalamus in den Barrel-Kortex eingehende Aktivität stark reduziert. Eingänge aus dem motorische und dem sekundären somatosensorischen Kortex spielen nur eine untergeordnete Rolle. Die neuronale Aktivität des Barrel-Kortex wird somit bis auf die Spontanaktivität reduziert. Das periodische Verteilungsmuster der zu L5 präsynaptischen L2/3 Neurone wird dadurch nicht ausgebildet. Die funktionelle Gruppierung der zu L5 projizierenden L2/3 Neurone in den peripheren Bereichen der Barrel-Kolumne ist aufgelöst. Die funktionelle Repräsentation der Kolumnen auf der Ebene intrakortikaler Verschaltungen ist von der korrelierten Aktivität, die durch die Vibrissen an den Barrel-Kortex übertragen wird, abhängig. Die synaptische Kopplung von Neuronen wird maßgeblich durch die eingehende sensorische Information beeinflusst.

Der nahezu ausschließlich vertikale Verlauf der in L2/3 endenden Projektionen sowie der L6 → L5 Projektionen innerhalb einer Kolumne wird ebenso durch die Übertragung der korrelierten Aktivität der Vibrissen an den Barrel-Kortex beeinflusst. Wird diese Aktivität durch Deprivation auf das Niveau der Spontanaktivität reduziert, prägen sich die kolumnären Grenzen weniger stark aus. Ein größerer Anteil der Projektionen verläuft zwischen benachbarten Kolumnen und verstärkt so deren Interaktion. Zudem erhöhte sich die Anzahl der präsynaptischen Neurone pro postsynaptisches L5 Neuron, was für eine stärkere und damit möglicherweise weniger spezifische Vernetzung der Neurone spricht. Somit werden durch die Reorganisation der synaptischen Verschaltungen die Projektionsgebiete kortikaler Neurone nach sensorischer Deprivation vergrößert. Diese Reorganisation kortikaler Verschaltungen kann für die anormale Entwicklung der rezeptiven Felder (RF) von Neuronen sensorisch deprivierter Tiere grundlegend sein. Nach sensorischer Deprivation erhöht sich die Anzahl der Vibrissen auf deren Stimulation ein Neuron im Barrel-Kortex antwortet, d.h. das RF vergrößerte sich (Simons und Land, 1987; Lendvai et al., 2000; Stern et al., 2001). Die Vergrößerung der Projektionsgebiete kortikaler Neurone kann für die Vergrößerung des RF verantwortlich sein. Die separierte, somatotope Darstellung der Vibrissen im Barrel-Kortex wird somit maßgeblich durch die korrelierte Aktivität, die von der Peripherie an den Barrel-Kortex weitergeleitet wird, beeinflusst. Laminäre Unterschiede bezüglich dem Ausmaß der plastischen Veränderung der L2/3 → L2/3 und der L4 → L2/3 Projektionen konnte durch vorliegende Daten nicht nachgewiesen werden. Die Anzahlen der interkolumnäre Projektionen aus L2/3 und L4 nahmen im selben Maße zu. Dies spricht für einen gemeinsamen Mechanismus innerhalb beider Laminae. *In vivo* Studien zeigen jedoch, dass innerhalb der ersten postnatalen Woche die Veränderungen der RF-Eigenschaften von L4 Neuronen durch Deprivation maximal sind. Danach nimmt das Ausmaß dieser sensorisch aktivitätsabhängigen Plastizität in L4 rapide ab, während es in L2/3 bis in das Erwachsenenalter erhalten bleibt (Fox, 1992, 2002). Somit lassen sich die Änderungen der RF-Eigenschaften nicht vollständig durch die hier geschilderte Reorganisation der synaptischen Verbindungen erklären.

#### 4.9.4 Mechanismen neuronaler Plastizität im Barrel-Kortex

Aktivitätsabhängige, kortikale Plastizität kann in L2/3 schon wenigen Stunden nach der sensorischen Deprivation nachgewiesen werden (Barth et al., 2000). Kurzfristige plastische Vorgänge werden auf die selektive Veränderungen der Übertragungsstärke an bereits bestehenden Synapsen zurückgeführt (Rausell and Jones, 1995; Huntley, 1997). Bei langfristigen, plastischen Prozessen dagegen werden zusätzlich neuronale Strukturen durch Abbau, Umbau und Neubildung von Synapsen reorganisiert (Buonomano und Merzenich, 1998). Die in der vorliegenden Arbeit durch Deprivation veränderten Verschaltungsmuster kortikaler Neurone können somit einerseits durch kurzfristige Modifikationen der synaptischen Übertragungsstärke, andererseits durch langfristige, strukturelle Neuorganisationen der synaptischen Verbindungen erklärt werden.

##### 4.9.4.1 Plastizität der synaptischen Übertragungsstärke

Durch das Absenken der Schwelle neuronaler Erregbarkeit können mittels Laserstimulation „neue“ Projektionen nachgewiesen werden, die vor sensorischer Deprivation anatomisch schon vorhanden waren, jedoch funktionell nicht nachweisbar waren. Umgekehrt können vorhandene Projektionen durch das Erhöhen der Schwelle neuronaler Erregbarkeit nicht mehr nachweisbar sein. Ein nachgewiesener Mechanismus zur Erhöhung der Erregungsschwelle ist die Reduktion der Dichte postsynaptischer Glutamaterezeptoren (Dolan und Cahusac, 1994).

Durch die Erhöhung der synaptischen Transmissionsstärke können aus zuvor nur anatomisch nachweisbaren ebenso funktionell nachweisbare synaptische Verbindungen werden. Hebb postulierte schon 1949: „Synapses are strengthened if there is temporal correlation between their pre- and postsynaptic patterns of activity.“ Korrelierte Aktivität bzw. korrelierte synaptische Eingänge sind wichtige Faktoren, die den Aufbau somatotoper Strukturen im Barrel-Kortex ermöglichen (Fox, 1992). Die Bewegungen der Vibrissen verursachen auf dem afferenten Signalübertragungsweg zum Barrel-Kortex stark korrelierte neuronale Aktivität. Ratten beginnen ab PND 12 ihre Vibrissen aktiv zu bewegen (Welker, 1964). Durch die hier gewählte Deprivation ab PND 9 überträgt der Thalamus keine durch die Vibrissenbewegung korrelierte synaptische Aktivität an den Barrel-Kortex. Korrelierte präsynaptische Aktivität ist für die Ausbildung funktioneller Verbindungen wichtig. Durch LTP-ähnliche (long-term-potential) Mechanismen können stille („silent“) Synapsen in funktionelle Synapsen umgewandelt werden (Crair und Malenka, 1995; Isaac et al., 1997). Bei diesem Vorgang findet man nach Aktivierung von NMDA-Rezeptoren AMPA-Rezeptoren in Synapsen, die zuvor nur NMDA-Rezeptoren enthielten (Shi et al., 1999). Die sensorische Aktivität spiegelt sich somit in der topographischen Repräsentation der Vibrissen im Barrel-Kortex wider. Durch sensorische Deprivation werden diese potenzierenden, aktivitätsabhängigen Mechanismen verhindert und die funktionellen Verschaltungen liefern ein unspezifisches Abbild der kortikalen Spontanaktivität.

Die zeitliche Abfolge prä- und postsynaptischer Aktivität an der Synapse ist ein entscheidender Faktor, ob die synaptische Übertragungsstärke potenziert oder abgeschwächt wird. Bei der synaptischen Transmission von L4 nach L2/3 wird LTP

ausgelöst, wenn das präsynaptische Aktionspotential (AP) 10-20ms vor dem postsynaptischen AP eintrifft. „Long term depression“ (LTD) wird dagegen ausgelöst, wenn das präsynaptische AP bis zu 100ms nach dem postsynaptischen AP eintrifft (Feldman, 2000). Durch Deprivation wird die Aktivität im Barrel-Kortex bis auf die Spontanaktivität reduziert. Die zeitlich enge Korrelation prä- und postsynaptischer Aktivität durch Stimulation der Vibrissen wird somit verhindert und LTP kann nicht mehr ausgelöst werden. Da das Zeitfenster zur Generierung von LTD um ein Vielfaches größer ist, kann durch die spontane Aktivität der deprivierten Eingänge LTD auch nach Deprivation ausgelöst werden.

Unklar ist jedoch ob elektrisch induzierte LTP bzw. LTD und die sensorisch aktivitätsabhängige Potenzierung bzw. Reduktion kortikaler Antworten gemeinsamen Mechanismen unterliegen. Einen Hinweis darauf liefert das Molekül Kalzium-Calmodulinkinase II (CAMKII). Gemäß der Lisman-Kennedy-Hypothese ist CAMKII ein molekularer Schalter, der durch postsynaptisches Kalzium/Calmodulin aktiviert wird, anschließend autophosphoryliert und damit funktionell ist (Miller und Kennedy, 1986; Lisman und Goldring, 1988; Lisman, 1989). Sowohl LTP als auch sensorische aktivitätsabhängige Plastizität können im adulten Barrel-Kortex nur ausprägt werden, wenn die aktive Form von CAMKII vorhanden ist (Glazewski et al., 1996, 2000). Eine weitere Parallele zwischen sensorischer aktivitätsabhängiger und synaptischer Aktivität liefern Versuche von Kirkwood und Mitarbeiter am visuellen Kortex optisch deprivierter Ratten. LTD trat hier im Vergleich zu nicht deprivierten Tieren in einer geringeren Ausprägung auf (Kirkwood et al., 1996). Dies kann dadurch begründet werden, dass LTD bzw. LTD-ähnliche Mechanismen schon durch die optische Deprivation ausgelöst wurden und die elektrische Induktion von LTD nur noch in geringem Ausmaß möglich war.

#### 4.9.4.2 Strukturelle Plastizität

Ein anatomisches Korrelat langfristiger kortikaler Plastizität bilden Veränderungen neuronaler Strukturen. Grobe strukturelle Veränderungen der Zytoarchitektur des Barrel-Kortex, wie die Barrel-Morphologie und der Verlauf der thalamokortikalen Afferenzen, sind nur durch Denervation innerhalb der ersten postnatalen Woche möglich (Weller und Johnson, 1975; Woolsey und Wann, 1976; Harris und Woolsey, 1981; Jeanmonod et al., 1981; Agmon und Connors, 1991; Schlaggar und O'Leary, 1991; Antonini und Stryker, 1993). Hierbei handelt es sich um aktivitätsunabhängige Entwicklungsvorgänge, die durch Deprivation nicht modifizierbar sind (siehe Kapitel 4.9.2).

Die Reorganisation synaptischer Verschaltungen durch Um- und Abbau vorhandener sowie durch Bildung neuer Axone und Synapsen kann jedoch durch die an den Kortex weitergeleitete Aktivität beeinflusst werden. Vorliegende Daten belegen, dass durch Deprivation die horizontale räumliche Ausdehnung intrakortikaler Verbindungen vergrößert wird. Zudem können nach Deprivation pro abgeleitetes L5 Pyramidenneuron mehr präsynaptische Zellen nachgewiesen werden. Dementsprechend nimmt sowohl die Länge als auch die Dichte der Axone im Vergleich zu nicht deprivierten Kontrolltieren zu (Darian-Smith und Gilbert, 1994; Kossut und Juliano, 1999).

Die Bildung von Synapsen während der Entwicklung hängt von genetischen wie auch modifikatorischen Einflüssen ab (zur Übersicht siehe Zito und Svoboda, 2002). Dem initialen Aufbau synaptischer Verbindungen, der unabhängig von sensorischer Aktivität ist, folgt die aktivitätsabhängige Feinabstimmung der Verschaltungen, die auch im adulten Kortex weiterhin statt findet (Gilbert, 1998). Umbau und Beweglichkeit dendritischer Spines weisen dabei eine Koinzidenz mit der Neubildung von Synapsen auf (Ziv und Smith, 1996). Nach Stimulation der Vibrissen oder Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zeigen dendritische Dornfortsätze und Filopodien ein vermehrtes Wachstum (Maletic-Savatic et al., 1999; Toni et al., 1999; Engert und Bonhoeffer, 1999; Knott et al., 2002). Daraus lässt sich schließen, dass Synaptogenese durch synaptische Aktivität induziert wird (Zito et al., 2002). Sensorische Deprivation verändert nicht nur die Morphologie dendritischer Dornfortsätze, sondern reduziert auch ihre Beweglichkeit und

Umbaurate (Micheva und Beaulieu, 1995; Veas et al., 1998; Lendvai et al., 2000). Somit wird durch sensorische Deprivation die Neubildung von Synapsen reduziert, nicht jedoch die Anzahl der bestehenden Synapsen (Veas et al., 1998; Lendvai et al., 2000; Sadaka et al., 2000). Die in der vorliegenden Arbeit durch Deprivation veränderten synaptischen Verschaltungsmuster im Barrel-Kortex können folglich auf aktivitätsabhängige Reorganisation synaptischer Verbindungen zurückgeführt werden.

#### **4.9.4.3 NMDA-Rezeptoren und sensorische aktivitätsabhängige Plastizität**

NMDA-Rezeptoren spielen in der Entwicklung wie auch bei plastischen Veränderungen im Barrel-Kortex eine große Rolle. Durch NMDA-Rezeptoren werden synaptische Fehlverbindungen korrigiert und simultan aktive Synapsen bleiben erhalten (Schlaggar et al., 1993; Fox et al., 1996). Die morphogenetische Plastizität des Barrel-Kortex, die sich durch Veränderungen der Barrel-Struktur manifestiert, wird nicht mehr ausgeprägt, wenn NMDA- oder AMPA-Rezeptoren nicht aktivierbar sind (Schlaggar et al., 1993). Die funktionelle topographische Repräsentation der Vibrissen im Barrel-Kortex zeigt nach Blockade der NMDA-Rezeptoren keine Plastizität mehr. Das heißt nach Läsion der Vibrissenfollikel werden denervierte Vibrissen nicht wie erwartet im Barrel-Kortex somatotop unterrepräsentiert und ausgesparte Vibrissen nicht überrepräsentiert (Kano et al., 1991; Jablonska, 1995). Die RF der Neurone bleiben von sensorischer Deprivation unbeeinflusst, wenn die NMDA-Rezeptoren blockiert werden (Rema et al., 1998). Langdon und Sur stellten die Hypothese auf, dass die Reduktion bzw. Erhöhung der in den Kortex eingehenden, korrelierten Aktivität mittels NMDA-Rezeptoren die Synchronisation kortikaler Neurone verändert (Langdon und Sur, 1992). Diese Befunde deuten darauf hin, dass kortikale Plastizität NMDA-Rezeptor abhängig ist.

## 5. Zusammenfassung

Der Barrel-Kortex, als Teil des primären somatosensorischen Kortex, repräsentiert somatotop die Vibrissen des Schnauzenbärtchens der *Rodentia* (Nagetiere). Einerseits spiegeln sie sich topographisch innerhalb Lamina 4 in Form der morphologisch sichtbaren „Barrels“ (Fässchen) wider, andererseits in Form der sich über alle Laminae erstreckenden funktionellen Kolumnen. Aufgrund dieser morphologischen wie auch funktionellen Korrelation von Vibrissen und Barrels bzw. Kolumnen ist der Barrel-Kortex ein geeignetes Modell zur Untersuchung von **Struktur und Funktion sowie Plastizität kortikaler synaptischer Verschaltungen**. Ein detailliertes Bild der Organisation neuronaler Verschaltungen ist die Voraussetzung, um deren Funktionalität verstehen zu können. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit synaptisch gekoppelte Neurone bezüglich der laminären (Lamina 1-6) und kolumnären Strukturen (zentrale und periphere Bereiche der Barrel-Kolumne) des Barrel-Kortex lokalisiert. Zu diesem Zweck wurde die Lage präsynaptischer Neurone, die zu Pyramidenneuronen der Lamina 2/3 und 5 projizieren, funktionell kartiert sowie deren synaptische Verbindungen charakterisiert. Neben diesem bis auf Einzelzell-Ebene aufgelösten Bild des neuronalen Netzwerkes wurden die synaptischen Interaktionen einer Vielzahl von Neuronen über größere Bereiche dargestellt. Somit lies sich die Weiterleitung der neuronalen Erregung bezüglich der kolumnären und laminären Strukturen des Barrel-Kortex nach intrakortikaler Stimulation darstellen. Des Weiteren wurde untersucht, ob die in den Kortex eingehende sensorische Information einen Einfluss auf die Entwicklung und Plastizität dieses neuronalen Netzwerkes hat. Dazu wurden die Auswirkungen **sensorischer Deprivation** auf die synaptischen Verschaltungen von Neuronen im Barrel-Kortex sowohl auf Einzelzell- wie auch auf Mehrzell-Ebene analysiert. Sensorisch deprivierten Tieren wurde zu diesem Zweck die Vibrissen während der kortikalen Synaptogenese abgeschnitten.

Die hochauflösende Methode der **Infrarot-gelenkten Photostimulation** (siehe Kapitel 2.4) ermöglichte es, Nervenzellen im akuten Hirnschnitt zu visualisieren und einzelne Somata mutmaßlich präsynaptischer Neurone durch photolytische Applikation von Glutamat zu stimulieren. Die daraus resultierenden Antworten des postsynaptischen Neurons wurden mit der **"Patch-Clamp"-Technik** (siehe Kapitel 2.5) abgeleitet. Dadurch ließen sich große Bereiche des Kortex nach synaptisch gekoppelten Neuronen abrastern, die eine funktionelle Verbindung aufwiesen. In Vorexperimenten wurde die räumliche Auflösung der Infrarot-gelenkten Photostimulation optimiert, so dass es möglich war, synaptische Transmission spezifisch an den Somata und nicht an den Dendriten der Neurone zu imitieren. Die **Somaspezifität** der Photostimulation (siehe Kapitel 3.2.1) ist eine Voraussetzung für das sinnvolle Kartieren von Neuronen im Kortex, da die Dendriten sich über eine Länge von mehreren Millimetern erstrecken können. Der Parameter, der sich hierbei effektiv modifizieren lies, war die Größe des stimulierten Areals. Die größte Somaspezifität wurde erreicht, wenn die beleuchtete Membranfläche einen Durchmesser von 8µm hatte und damit etwa die Größe eines neuronalen Somas erreichte. Bei diesem Wert ist die stimulierte Membranfläche am Soma maximal, am Dendriten dagegen minimal. Bestätigt wurde die Somaspezifität der angewandten Stimulationstechnik durch Doppelableitung des postsynaptischen Neurons sowie des mittels Photostimulation vorab ermittelten präsynaptischen Neurons.

Präsynaptische Neurone, die auf L2/3 Pyramidenneurone verschalten (→ **L2/3**, siehe Kapitel 3.2.2.1), wurden überwiegend in L2/3 selbst sowie in L4 gefunden. L5 → L2/3 Projektionen waren vergleichsweise selten zu finden. Projektionen aus L1 und L6 konnten nicht nachgewiesen werden. Der größte Teil der präsynaptischen Neurone, die auf L2/3 Pyramidenzellen projizieren, war in der ersten Barrel-Kolumne, die an den Ableitort angrenzt, lokalisiert (**intrakolumnäre → L2/3 Projektionen**, Abbildung 5.1 A). Nur ein kleiner Anteil aller → L2/3 Projektionen hatte ihren Ursprung in der zweiten und dritten Barrel-Kolumne. Somit spiegelt sich die kortikale Kolumne als einheitliches sensorisches Verarbeitungsmodul einer Vibrisse auch in den intrakortikalen synaptische Verschaltung wider. Durch sensorische Deprivation stieg die Anzahl der zu **interkolumnären → L2/3 Projektionen** um etwa das Doppelte an. Die Reduktion der in den Kortex eingehenden

sensorischen Information bewirkte bevorzugt in L2/3 und L4 eine Verschiebung der auf L2/3 projizierenden, präsynaptischen Neurone von der ersten zur zweiten Barrel-Kolumne (siehe Kapitel 3.2.4.1). Die funktionelle Grenze zwischen den Barrelkolumnen, definiert durch die intrakolumnären Projektionen, wird nach Deprivation durch die vermehrten interkolumnären Projektionen verwischt. Die von L2/3 wie auch von L5 Pyramidenneuronen abgeleiteten EPSPs wurden vor wie auch nach sensorischer Deprivation überwiegend durch nicht-NMDA-Rezeptoren vermittelt. Eine Beteiligung der NMDA-Rezeptoren war nur in wenigen Fällen nachweisbar. Die ist unter anderem auf die niedrige Spontanaktivität der *in vitro* Präparation zurückzuführen.

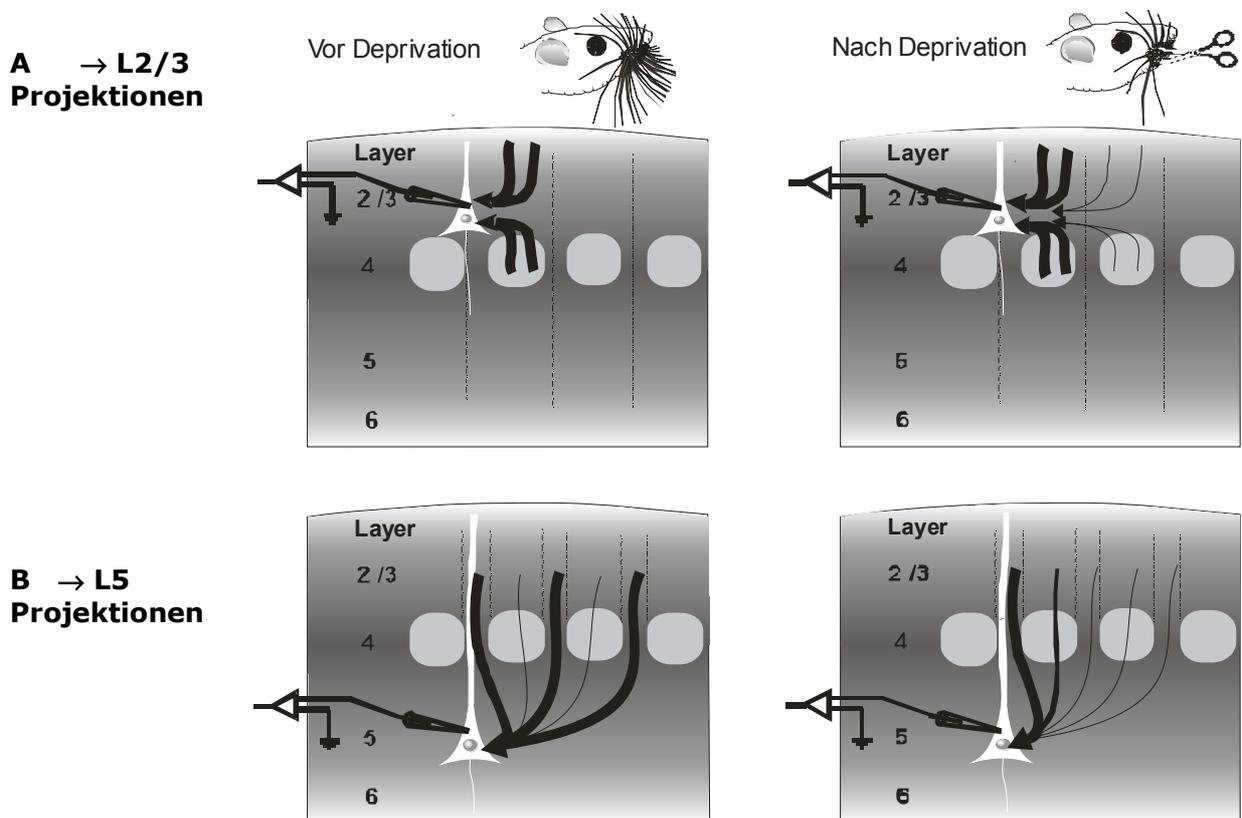
Die meisten Neurone, die auf L5 Pyramidenneuronen projizieren (→ **L5**, siehe Kapitel 3.2.2.2), waren in L5 selbst lokalisiert und bilden daher ein dichtes, lokal sehr begrenztes intralaminäres Netzwerk. Die Häufigkeit der L5 → L5 Projektionen ebenso wie die wie auch deren resultierende EPSP-Amplitude nahm linear ab mit zunehmendem Abstand zwischen dem stimulierten und dem abgeleiteten Neuron. L2/3 → L5 Projektionen, kommen dagegen ebenso wie L4 → L5 und L6 → L5 Projektionen eher selten vor. L1 → L5 Projektionen sind nicht nachweisbar. Die interlaminären L2/3 → L5 Projektionen zeigten ein statistisch signifikantes **periodisches Verschaltungsmuster** (Abbildung 5.1 B): Sie waren um ein Vielfaches häufiger in Bereichen lokalisiert, die über den Barrel-Seiten lagen (Kolumnen-Wände), und nur sehr selten in Bereichen, die über den Barrel-Höhlen lagen (Kolumnen-Zentren). Das periodische Eingangsmuster der L2/3 → L5 Projektionen spiegelt somit auf der funktionellen Ebene die Struktur der Barrel-Kolumne wider. Im Gegensatz dazu konnte ein solch periodisches Muster der synaptischen Eingänge in Hirnschnitten deprivierter Tiere nicht mehr beobachtet werden (siehe Kapitel 3.2.4.2). Stattdessen nahm die Häufigkeit der L2/3 → L5 Projektionen linear mit zunehmender lateraler Distanz zwischen stimuliertem und abgeleitetem Neuron ab. Somit war im Barrel-Kortex deprivierter Tieren die funktionelle Repräsentation der kortikalen Kolumne anhand der L2/3 → L5 Projektionen nicht mehr nachzuweisen. Ein weiterer Effekt der sensorischen Deprivation war die Erhöhung der Anzahl präsynaptischer Neurone pro abgeleitetes postsynaptisches L5 Neuron. Dies spricht für eine stärkere und damit möglicherweise weniger spezifische Vernetzung der Neurone.

Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass die sensorische Aktivierung des Barrel-Kortex durch Stimulation der Vibrissen die Entwicklung der intrakortikalen synaptischen Verschaltungen maßgeblich beeinflusst. Die kolumnäre Organisation des Barrel-Kortex, die in den Barrels der Lamina 4 anatomisch manifestiert sind, wird funktionell durch die Organisation der intrakortikalen, synaptischen Verschaltungen repräsentiert. Durch Deprivation wird die an den Kortex vermittelte sensorische Information stark reduziert. Die funktionelle Repräsentation der Kolumnen auf der Ebene intrakortikaler Verschaltungen ist von der korrelierten Aktivität, die durch die Vibrissen an den Barrel-Kortex übertragen wird, abhängig. Die intrakortikale Synaptogenese ist somit ein **aktivitätsabhängiger** Prozess, der - im Gegensatz zur Barrel-Morphologie - durch sensorische Deprivation beeinflusst werden kann.

Inhibitorische postsynaptische Potentiale (**IPSPs**, siehe Kapitel 3.2.3) wurden durch IR-gelenkte Photo-stimulation im Vergleich zu EPSPs vor wie auch nach Deprivation nur selten ausgelöst. Das ist einerseits darauf zurückzuführen, dass die Mehrheit der neuronalen Verbindungen im Kortex ist exzitatorisch. Andererseits liegt das Umkehrpotential der IPSP vermittelnden  $\text{Cl}^-$ -Ionen nahe am Ruhemembranpotential der abgeleiteten Pyramidenneurone.

Ergänzend zur bis auf Einzell-Ebene hochauflösenden Netzwerkanalyse mittels IR-gelenkter Photostimulation wurde ein bildgebendes Verfahren angewandt, das die **intrinsisch optischen Signale** (IOS) des stimulierten neuronalen Gewebes durch Infrarot-Dunkelfeldmikroskopie visualisiert (siehe Kapitel 2.6). Mit Hilfe dieser **„Imaging“-Technik** wurde die räumliche Weiterleitung der neuronalen Erregung nach intrakortikaler Stimulation verschiedener kolumnärer und laminärer Strukturen des Barrel-Kortex dargestellt werden. Dadurch lassen sich die synaptischen Interaktionen einer Vielzahl von Neuronen über größere Bereiche charakterisieren. In Abhängigkeit vom Stimulationsort ergeben sich unterschiedliche **Muster neuronaler Aktivität** (siehe Kapitel 3.3). Die L4 Barrels zeigen sich als funktionell unabhängige Einheiten, die im

Gegensatz zu L2/3 keine sensorischer Information zu benachbarten Barrels horizontal weiterleiten. Die vom Thalamus in den Kortex eingehende sensorische Information wird von L4 innerhalb einer Kolumne nur vertikal an L2/3 weitergeleitet. In L2/3 wird die neuronale Aktivität horizontal an Nachbarkolumnen übertragen. Vor allem die Neurone in den peripheren Bereichen der L2/3 Barrel-Kolumne integrieren über die angrenzenden Kolumnen. Diese horizontale Weiterleitung neuronaler Aktivität in supragranulären Laminae wird durch GABAerge Interneurone reguliert. Durch Stimulation peripherer Kolumnenbereiche infragranulärer Laminae werden überwiegend die Seiten der Kolumnen aktiviert. Werden dagegen zentrale Kolumnenbereiche stimuliert breitet sich die neuronale Erregung über die gesamte Kolumne aus. Dies zeigt einerseits die überwiegend vertikale Übertragung neuronaler Aktivität von L5 innerhalb der Barrel-Kolumne. Zudem sprechen diese Befunde bezüglich der synaptischen Verschaltung für eine funktionelle Unterteilung der Barrel-Kolumne in zentralen und peripheren Bereiche wie auch schon durch die Periodizität der L2/3 → L5 Projektionen auf Einzelzell-Ebene belegt. Die peripheren Bereiche der Barrel-Kolumne sind somit funktionell unabhängige Verarbeitungsmodulare, die die Informationen über mehrere angrenzende Barrel-Kolumnen integrieren.



**Abbildung 5.1**

- A** → L2/3 Projektionen, die vor Deprivation strikt intrakolumnär organisierte sind. Nach Deprivation verlaufen sie jedoch auch interkolumnär.
- B** Periodizität der L2/3 → L5 Projektionen, die nach Deprivation nicht mehr nachweisbar ist.

## 6. Anhang

### 6.1 Literatur

1. Abeles M, Prut Y, Bergman H, Vaadia E (1994) Synchronization in neuronal transmission and its importance for information processing. *Prog Brain Res* 102: 395-404.
2. Adams SR, Tsien RY (1993) Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu Rev Physiol* 55: 755-784.
3. Agmon A, Connors BW (1989) Repetitive burst-firing neurons in the deep layers of mouse somatosensory cortex. *Neurosci Lett* 99: 137-141.
4. Agmon A, Connors BW (1991) Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience* 41: 365-379.
5. Agmon A, Connors BW (1992) Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex. *J Neurosci* 12: 319-329.
6. Aitken PG, Fayuk D, Somjen GG, Turner DA (1999) Use of intrinsic optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods* 18: 91-103.
7. Akers RM, Killackey HP (1978) Organization of corticocortical connections in the parietal cortex of the rat. *J Comp Neurol* 181: 513-537.
8. al Ghouli WM, Miller MW (1993) Development of the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve of the rat and evidence for a transient synaptic field in the trigeminal sensory tract. *J Comp Neurol* 330: 476-490.
9. Anderson JC, Douglas RJ, Martin KA, Nelson JC (1994) Map of the synapses formed with the dendrites of spiny stellate neurons of cat visual cortex. *J Comp Neurol* 341: 25-38.
10. Andreasen M, Hablitz JJ (1994) Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus: a patch-clamp study in rat hippocampus in vitro. *J Neurophysiol* 72: 326-336.
11. Andrew RD, Lobinowich ME, Osehobo EP (1997) Evidence against volume regulation by cortical brain cells during acute osmotic stress. *Exp Neurol* 143: 300-312.
12. Andrew RD, MacVicar BA (1994) Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience* 62: 371-383.
13. Antonini A, Stryker MP (1993) Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science* 260: 1819-1821.
14. Armstrong-James M (1975) The functional status and columnar organization of single cells responding to cutaneous stimulation in neonatal rat somatosensory cortex S1. *J Physiol* 246: 501-538.
15. Armstrong-James M, Callahan CA (1991) Thalamo-cortical processing of vibrissal information in the rat. II. spatiotemporal convergence in the thalamic ventropos-

- terior medial nucleus (VPM) and its relevance to generation of receptive fields of S1 cortical "barrel" neurones. *J Comp Neurol* 303: 211-224.
16. Armstrong-James M, Callahan CA, Friedman MA (1991) Thalamo-cortical processing of vibrissal information in the rat. I. Intracortical origins of surround but not centre-receptive fields of layer IV neurones in the rat S1 barrel field cortex. *J Comp Neurol* 303: 193-210.
  17. Armstrong-James M, Diamond ME, Ebner FF (1994) An innocuous bias in whisker use in adult rats modifies receptive fields of barrel cortex neurons. *J Neurosci* 14: 6978-6991.
  18. Armstrong-James M, Fox K (1983) Effects of ionophoresed noradrenaline on the spontaneous activity of neurones in rat primary somatosensory cortex. *J Physiol* 335: 427-447.
  19. Armstrong-James M, Fox K (1987) Spatiotemporal convergence and divergence in the rat S1 "barrel" cortex. *J Comp Neurol* 263: 265-281.
  20. Armstrong-James M, Fox K (1988) Evidence for a specific role for cortical NMDA receptors in slow-wave sleep. *Brain Res* 451: 189-196.
  21. Armstrong-James M, Fox K, Das-Gupta A (1992) Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J Neurophysiol* 68: 1345-1358.
  22. Armstrong-James M, Welker E, Callahan CA (1993) The contribution of NMDA and non-NMDA receptors to fast and slow transmission of sensory information in the rat SI barrel cortex. *J Neurosci* 13: 2149-2160.
  23. Arnold PB, Li CX, Waters RS (2001) Thalamocortical arbors extend beyond single cortical barrels: an in vivo intracellular tracing study in rat. *Exp Brain Res* 136: 152-168.
  24. Artola A, Singer W (1987) Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature* 330: 649-652.
  25. Artola A, Singer W (1990) The Involvement of N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in Rat Visual Cortex. *Eur J Neurosci* 2: 254-269.
  26. Arvidsson J, Rice FL (1991) Central projections of primary sensory neurons innervating different parts of the vibrissae follicles and intervibrissal skin on the mystacial pad of the rat. *J Comp Neurol* 309: 1-16.
  27. Barth AL, McKenna M, Glazewski S, Hill P, Impey S, Storm D, Fox K (2000) Upregulation of cAMP response element-mediated gene expression during experience-dependent plasticity in adult neocortex. *J Neurosci* 20: 4206-4216.
  28. Belford GR, Killackey HP (1980) The sensitive period in the development of the trigeminal system of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 193: 335-350.
  29. Ben Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3: 728-739.
  30. Benardo LS (1994) Separate activation of fast and slow inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortex in vitro. *J Physiol* 476: 203-215.

31. Bernardo KL, McCasland JS, Woolsey TA (1990a) Local axonal trajectories in mouse barrel cortex. *Exp Brain Res* 82: 247-253.
32. Bernardo KL, McCasland JS, Woolsey TA, Strominger RN (1990b) Local intra- and interlaminar connections in mouse barrel cortex. *J Comp Neurol* 291: 231-255.
33. Bernardo KL, Woolsey TA (1987) Axonal trajectories between mouse somatosensory thalamus and cortex. *J Comp Neurol* 258: 542-564.
34. Blanton MG, Lo Turco JJ, Kriegstein AR (1989) Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 30: 203-210.
35. Blue ME, Johnston MV (1995) The ontogeny of glutamate receptors in rat barrel field cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 84: 11-25.
36. Blue ME, Martin LJ, Brennan EM, Johnston MV (1997) Ontogeny of non-NMDA glutamate receptors in rat barrel field cortex: I. Metabotropic receptors. *J Comp Neurol* 386: 16-28.
37. Brecht M, Preilowski B, Merzenich MM (1997) Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav Brain Res* 84: 81-97.
38. Brecht M, Sakmann B (2002) Dynamic representation of whisker deflection by synaptic potentials in spiny stellate and pyramidal cells in the barrels and septa of layer 4 rat somatosensory cortex. *J Physiol* 543: 49-70.
39. Brodman K. (1909) *Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde*. Leipzig: Barth.
40. Brumberg JC, Pinto DJ, Simons DJ (1996) Spatial gradients and inhibitory summation in the rat whisker barrel system. *J Neurophysiol* 76: 130-140.
41. Buchheim K, Schuchmann S, Siegmund H, Gabriel HJ, Heinemann U, Meierkord H (1999) Intrinsic optical signal measurements reveal characteristic features during different forms of spontaneous neuronal hyperactivity associated with ECS shrinkage in vitro. *Eur J Neurosci* 11: 1877-1882.
42. Burgard EC, Hablitz JJ (1993) NMDA receptor-mediated components of miniature excitatory synaptic currents in developing rat neocortex. *J Neurophysiol* 70: 1841-1852.
43. Burkhalter A (1989) Intrinsic connections of rat primary visual cortex: laminar organization of axonal projections. *J Comp Neurol* 279: 171-186.
44. Callaway EM, Katz LC (1993) Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7661-7665.
45. Callaway EM, Wiser AK (1996) Contributions of individual layer 2-5 spiny neurons to local circuits in macaque primary visual cortex. *Vis Neurosci* 13: 907-922.
46. Callaway EM, Yuste R (2002) Stimulating neurons with light. *Curr Opin Neurobiol* 12: 587-592.
47. Carvell GE, Simons DJ (1987) Thalamic and corticocortical connections of the second somatic sensory area of the mouse. *J Comp Neurol* 265: 409-427.

48. Carvell GE, Simons DJ (1988) Membrane potential changes in rat SmI cortical neurons evoked by controlled stimulation of mystacial vibrissae. *Brain Res* 448: 186-191.
49. Carvell GE, Simons DJ (1990) Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10: 2638-2648.
50. Carvell GE, Simons DJ (1996) Abnormal tactile experience early in life disrupts active touch. *Journal of Neuroscience* 16: 2750-2757.
51. Carvell GE, Simons DJ, Lichtenstein SH, Bryant P (1991) Electromyographic activity of mystacial pad musculature during whisking behavior in the rat. *Somatosens Mot Res* 8: 159-164.
52. Chagnac-Amitai Y, Connors BW (1989) Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol* 61: 747-758.
53. Chagnac-Amitai Y, Luhmann HJ, Prince DA (1990) Burst generating and regular spiking layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex have different morphological features. *J Comp Neurol* 296: 598-613.
54. Chapin JK (1986) Laminar differences in sizes, shapes, and response profiles of cutaneous receptive fields in the rat SI cortex. *Exp Brain Res* 62: 549-559.
55. Chapin JK, Lin CS (1984) Mapping the body representation in the SI cortex of anesthetized and awake rats. *J Comp Neurol* 229: 199-213.
56. Chapin JK, Sadeq M, Guise JL (1987) Corticocortical connections within the primary somatosensory cortex of the rat. *J Comp Neurol* 263: 326-346.
57. Chiaia NL, Bauer WR, Zhang S, King TA, Wright PC, Hobler SC, Freeman KA (1992a) Effects of neonatal transection of the infraorbital nerve upon the structural and functional organization of the ventral posteromedial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 326: 561-579.
58. Chiaia NL, Fish SE, Bauer WR, Bennett-Clarke CA, Rhoades RW (1992b) Postnatal blockade of cortical activity by tetrodotoxin does not disrupt the formation of vibrissa-related patterns in the rat's somatosensory cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 66: 244-250.
59. Chiaia NL, Rhoades RW, Fish SE, Killackey HP (1991) Thalamic processing of vibrissal information in the rat: II. Morphological and functional properties of medial ventral posterior nucleus and posterior nucleus neurons. *J Comp Neurol* 314: 217-236.
60. Chmielowska J, Carvell GE, Simons DJ (1989) Spatial organization of thalamocortical and corticothalamic projection systems in the rat SmI barrel cortex. *J Comp Neurol* 285: 325-338.
61. Chmielowska J, Kossut M, Chmielowski M (1986a) Single vibrissal cortical column in the mouse labeled with 2-deoxyglucose. *Exp Brain Res* 63: 607-619.
62. Chmielowska J, Stewart MG, Bourne RC, Hamori J (1986b) gamma-Aminobutyric acid immunoreactivity in mouse barrel field: a light microscopical study. *Brain Res* 368: 371-374.

63. Collingridge GL, Bliss TV (1995) Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* 18: 54-56.
64. Connors BW, Gutnick MJ, Prince DA (1982) Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *J Neurophysiol* 48: 1302-1320.
65. Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13: 99-104.
66. Conti F, Rustioni A, Petrusz P, Towle AC (1987) Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. *J Neurosci* 7: 1887-1901.
67. Crair MC, Malenka RC (1995) A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375: 325-328.
68. Crandall JE, Korde M, Caviness VS, Jr. (1986) Somata of layer V projection neurons in the mouse barrelfield cortex are in preferential register with the sides and septa of the barrels. *Neurosci Lett* 67: 19-24.
69. Crick FH (1979) Thinking about the brain. *Sci Am* 241: 219-232.
70. D'Amato RJ, Blue ME, Largent BL, Lynch DR, Ledbetter DJ, Molliver ME, Snyder SH (1987) Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4322-4326.
71. Dalva MB, Katz LC (1994) Rearrangements of synaptic connections in visual cortex revealed by laser photostimulation. *Science* 265: 255-258.
72. Darian-Smith C, Gilbert CD (1994) Axonal sprouting accompanies functional reorganization in adult cat striate cortex. *Nature* 368: 737-740.
73. Das A, Gilbert CD (1995) Long-range horizontal connections and their role in cortical reorganization revealed by optical recording of cat primary visual cortex. *Nature* 375: 780-784.
74. Deuchars J, West DC, Thomson AM (1994) Relationships between morphology and physiology of pyramid-pyramid single axon connections in rat neocortex in vitro. *J Physiol* 478 Pt 3: 423-435.
75. Diamond ME, Armstrong-James M, Budway MJ, Ebner FF (1992a) Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus: dependence on the barrel field cortex. *J Comp Neurol* 319: 66-84.
76. Diamond ME, Armstrong-James M, Ebner FF (1992b) Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus. *J Comp Neurol* 318: 462-476.
77. Diamond ME, Armstrong-James M, Ebner FF (1993) Experience-dependent plasticity in adult rat barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2082-2086.
78. Dietrich WD, Durham D, Lowry OH, Woolsey TA (1982) "Increased" sensory stimulation leads to changes in energy-related enzymes in the brain. *J Neurosci* 2: 1608-1613.

79. Dodt HU, D'Arcangelo G, Pestel E, Zieglgänsberger W (1996) The spread of excitation in neocortical columns visualized with infrared-darkfield videomicroscopy. *Neuroreport* 7: 1553-1558.
80. Dodt HU, Zieglgänsberger W (1990) Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy. *Brain Res* 537: 333-336.
81. Dolan S, Cahusac PM (1996) Differential effect of whisker trimming on excitatory and inhibitory transmission in primary somatosensory cortex of the adult rat in vivo. *Neuroscience* 70: 79-92.
82. Dörfl J (1982) The musculature of the mystacial vibrissae of the white mouse. *J Anat* 135: 147-154.
83. Dörfl J (1985) The innervation of the mystacial vibrissae of the white mouse. A topographical study. *Journal of Anatomy* 142: 184.
84. Dori I, Dinopoulos A, Cavanagh ME, Parnavelas JG (1992) Proportion of glutamate- and aspartate-immunoreactive neurons in the efferent pathways of the rat visual cortex varies according to the target. *J Comp Neurol* 319: 191-204.
85. Douglas RJ, Mahowald M, Martin KA, Stratford KJ (1996) The role of synapses in cortical computation. *J Neurocytol* 25: 893-911.
86. Douglas RJ, Martin KA (1991) A functional microcircuit for cat visual cortex. *J Physiol* 440: 735-769.
87. Durham D, Woolsey TA (1984) Effects of neonatal whisker lesions on mouse central trigeminal pathways. *J Comp Neurol* 223: 424-447.
88. Ebner FF, Armstrong-James MA (1990) Intracortical processes regulating the integration of sensory information. *Prog Brain Res* 86: 129-141.
89. Eder M (2000) Elektrophysiologische Untersuchungen zur glutamatergen und GABAergen Informationsübertragung an neocorticalen Pyramiden mit Hilfe Infrarot-gelenkter Photostimulation. In: (Dissertation).
90. Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* 414: 600-612.
91. Elhanany E, White EL (1990) Intrinsic circuitry: synapses involving the local axon collaterals of corticocortical projection neurons in the mouse primary somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 291: 43-54.
92. Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399: 66-70.
93. Erzurumlu RS, Jhaveri S (1990) Thalamic axons confer a blueprint of the sensory periphery onto the developing rat somatosensory cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 56: 229-234.
94. Escobar MI, Pimienta H, Caviness VS, Jr., Jacobson M, Crandall JE, Kosik KS (1986) Architecture of apical dendrites in the murine neocortex: dual apical dendritic systems. *Neuroscience* 17: 975-989.

95. Fabri M, Burton H (1991) Topography of connections between primary somatosensory cortex and posterior complex in rat: a multiple fluorescent tracer study. *Brain Res* 538: 351-357.
96. Farber IC, Grinvald A (1983) Identification of presynaptic neurons by laser photostimulation. *Science* 222: 1025-1027.
97. Favorov OV, Diamond ME (1990) Demonstration of discrete place-defined columns in the cat SI. *J Comp Neurol* 298: 97-112.
98. Favorov OV, Diamond ME, Whitsel BL (1987) Evidence for a mosaic representation of the body surface in area 3b of the somatic cortex of cat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6606-6610.
99. Fayuk D, Aitken PG, Somjen GG, Turner DA (2002) Two different mechanisms underlie reversible, intrinsic optical signals in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87: 1924-1937.
100. Fee MS, Mitra PP, Kleinfeld D (1997) Central versus peripheral determinants of patterned spike activity in rat vibrissa cortex during whisking. *Journal of Neurophysiology* 78: 1144-1149.
101. Feldman DE (2000) Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron* 27: 45-56.
102. Feldmeyer D, Egger V, Lubke J, Sakmann B (1999a) Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single 'barrel' of developing rat somatosensory cortex. *J Physiol* 521 Pt 1: 169-190.
103. Feldmeyer D, Kask K, Brusa R, Kornau HC, Kolhekar R, Rozov A, Burnashev N, Jensen V, Hvalby O, Sprengel R, Seeburg PH (1999b) Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat Neurosci* 2: 57-64.
104. Feldmeyer D, Lubke J, Silver RA, Sakmann B (2002) Synaptic connections between layer 4 spiny neurone-layer 2/3 pyramidal cell pairs in juvenile rat barrel cortex: physiology and anatomy of interlaminar signalling within a cortical column. *J Physiol* 538: 803-822.
105. Feldmeyer D, Sakmann B (2000) Synaptic efficacy and reliability of excitatory connections between the principal neurones of the input (layer 4) and output layer (layer 5) of the neocortex. *J Physiol* 525 Pt 1: 31-39.
106. Fonseca M, DeFelipe J, Fairen A (1988) Local connections in transplanted and normal cerebral cortex of rats. *Exp Brain Res* 69: 387-398.
107. Fox K (1992) A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex. *J Neurosci* 12: 1826-1838.
108. Fox K (1996) The role of excitatory amino acid transmission in development and plasticity of SI barrel cortex. *Prog Brain Res* 108: 219-234.
109. Fox K (2002) Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience* 111: 799-814.

110. Fox K, Armstrong-James M (1986) The role of the anterior intralaminar nuclei and N-methyl D-aspartate receptors in the generation of spontaneous bursts in rat neocortical neurones. *Exp Brain Res* 63: 505-518.
111. Fox K, Glazewski S, Chen CM, Silva A, Li X (1996) Mechanisms underlying experience-dependent potentiation and depression of vibrissae responses in barrel cortex. *J Physiol Paris* 90: 263-269.
112. Fox K, Sato H, Daw N (1990b) The effect of varying stimulus intensity on NMDA-receptor activity in cat visual cortex. *J Neurophysiol* 64: 1413-1428.
113. Fox K, Sato H, Daw N (1990a) The effect of varying stimulus intensity on NMDA-receptor activity in cat visual cortex. *J Neurophysiol* 64: 1413-1428.
114. Francis H (1979) What does the child mean? A critique of the 'functional' approach to language acquisition. *J Child Lang* 6: 201-210.
115. Frick A, Zieglgänsberger W, Dodt HU (2001) Glutamate receptors form hot spots on apical dendrites of neocortical pyramidal neurons. *J. Neurophysiol* 86: 1412-1421.
116. Fuchs JL (1989) [125I]alpha-bungarotoxin binding marks primary sensory area developing rat neocortex. *Brain Res* 501: 223-234.
117. Fuchs JL, Schwark HD (1993) Distribution of [3H]QNB and [125I]alpha-bungarotoxin binding and acetylcholinesterase activity in visual system and hippocampal structures of eleven mammalian species. *J Comp Neurol* 329: 427-437.
118. Fukuda M, Hata Y, Ohshima M, Tsumoto T (1998) Role of NMDA receptors in the propagation of excitation in rat visual cortex as studied by optical imaging. *Neurosci Res* 31: 9-21.
119. Gabbott PL, Martin KA, Whitteridge D (1987) Connections between pyramidal neurons in layer 5 of cat visual cortex (area 17). *J Comp Neurol* 259: 364-381.
120. Gilbert CD (1983) Microcircuitry of the visual cortex. *Annu Rev Neurosci* 6: 217-247.
121. Gilbert CD (1992) Horizontal integration and cortical dynamics. *Neuron* 9: 1-13.
122. Gilbert CD (1998) Adult cortical dynamics. *Physiol Rev* 78: 467-485.
123. Gilbert CD, Wiesel TN (1979) Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. *Nature* 280: 120-125.
124. Gilbert CD, Wiesel TN (1983) Clustered intrinsic connections in cat visual cortex. *J Neurosci* 3: 1116-1133.
125. Giuffrida R, Rustioni A (1989) Glutamate and aspartate immunoreactivity in cortico-cortical neurons of the sensorimotor cortex of rats. *Exp Brain Res* 74: 41-46.
126. Glazewski S (1998) Experience-dependent changes in vibrissae evoked responses in the rodent barrel cortex. *Acta Neurobiol Exp (Warsz )* 58: 309-320.
127. Glazewski S, Chen CM, Silva A, Fox K (1996) Requirement for alpha-CaMKII in experience-dependent plasticity of the barrel cortex. *Science* 272: 421-423.

128. Glazewski S, Fox K (1996) Time course of experience-dependent synaptic potentiation and depression in barrel cortex of adolescent rats. *J Neurophysiol* 75: 1714-1729.
129. Glazewski S, Giese KP, Silva A, Fox K (2000) The role of alpha-CaMKII autophosphorylation in neocortical experience-dependent plasticity. *Nat Neurosci* 3: 911-918.
130. Glazewski S, McKenna M, Jacquin M, Fox K (1998) Experience-dependent depression of vibrissae responses in adolescent rat barrel cortex. *Eur J Neurosci* 10: 2107-2116.
131. Goldreich D, Kyriazi HT, Simons DJ (1999) Functional independence of layer IV barrels in rodent somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 82: 1311-1316.
132. Gottlieb JP, Keller A (1997) Intrinsic circuitry and physiological properties of pyramidal neurons in rat barrel cortex. *Exp Brain Res* 115: 47-60.
133. Gouras P (1958) Spreading Depression of Activity in Amphibian Retina. *American Journal of Physiology* 195: 28-32.
134. Gruner JE, Hirsch JC, Sotelo C (1974) Ultrastructural features of the isolated suprasylvian gyrus in the cat. *J Comp Neurol* 154: 1-27.
135. Gullledge AT, Stuart GJ (2003) Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* 37: 299-309.
136. Harris RM, Woolsey TA (1981) Dendritic plasticity in mouse barrel cortex following postnatal vibrissa follicle damage. *J Comp Neurol* 196: 357-376.
137. Hata Y, Tsumoto T, Sato H, Hagihara K, Tamura H (1993) Development of local horizontal interactions in cat visual cortex studied by cross-correlation analysis. *J Neurophysiol* 69: 40-56.
138. Hebb DO (1949) *The Organization of Behaviour*. (John Wiley & Sons., ed), New York.
139. Hendry SH, Jones EG, Hockfield S, McKay RD (1988) Neuronal populations stained with the monoclonal antibody Cat-301 in the mammalian cerebral cortex and thalamus. *J Neurosci* 8: 518-542.
140. Hersch SM, White EL (1981a) Thalamocortical synapses with corticothalamic projection neurons in mouse SmI cortex: electron microscopic demonstration of a monosynaptic feedback loop. *Neurosci Lett* 24: 207-210.
141. Hersch SM, White EL (1981b) Quantification of synapses formed with apical dendrites of Golgi-impregnated pyramidal cells: variability in thalamocortical inputs, but consistency in the ratios of asymmetrical to symmetrical synapses. *Neuroscience* 6: 1043-1051.
142. Hersch SM, White EL (1981c) Thalamocortical synapses involving identified neurons in mouse primary somatosensory cortex: a terminal degeneration and golgi/EM study. *J Comp Neurol* 195: 253-263.
143. Hess GP, Niu L, Wieboldt R (1995) Determination of the chemical mechanism of neurotransmitter receptor-mediated reactions by rapid chemical kinetic methods. *Ann N Y Acad Sci* 757: 23-39.

144. Hill DK, Keynes RD (1949) Opacity changes in stimulated nerve. *Journal of Physiology - London* 108: 278-281.
145. Höflinger BF, Bennett-Clarke CA, Chiaia NL, Killackey HP, Rhoades RW (1995) Patterning of local intracortical projections within the vibrissae representation of rat primary somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 354: 551-563.
146. Holmes WR, Segev I, Rall W (1992) Interpretation of time constant and electrotonic length estimates in multicylinder or branched neuronal structures. *J Neurophysiol* 68: 1401-1420.
147. Holthoff K, Dodt HU, Witte OW (1994) Changes in intrinsic optical signal of rat neocortical slices following afferent stimulation. *Neurosci Lett* 180: 227-230.
148. Holthoff K, Witte OW (1996) Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J Neurosci* 16: 2740-2749.
149. Holthoff K, Witte OW (1998) Intrinsic optical signals in vitro: a tool to measure alterations in extracellular space with two-dimensional resolution. *Brain Res Bull* 47: 649-655.
150. Hoogland PV, Welker E, Van der LH (1987) Organization of the projections from barrel cortex to thalamus in mice studied with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin and HRP. *Exp Brain Res* 68: 73-87.
151. Howe JR, Sutor B, Zieglgänsberger W (1987) Baclofen reduces post-synaptic potentials of rat cortical neurones by an action other than its hyperpolarizing action. *J Physiol* 384: 539-569.
152. Hüttner JE, Baughman RW (1988) The pharmacology of synapses formed by identified corticocollicular neurons in primary cultures of rat visual cortex. *J Neurosci* 8: 160-175.
153. Huntley GW (1997) Correlation between patterns of horizontal connectivity and the extend of short-term representational plasticity in rat motor cortex. *Cereb Cortex* 7: 143-156.
154. Hyashi H. (1980) Distribution of vibrissae afferent fibre collaterals in the trigeminal nuclei as revealed by intra-axonal injection of HRP. *Brain Res* 183.
155. Insel TR, Miller LP, Gelhard RE (1990) The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain--I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* 35: 31-43.
156. Isaac JT, Crair MC, Nicoll RA, Malenka RC (1997) Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron* 18: 269-280.
157. Ito M (1985) Processing of vibrissa sensory information within the rat neocortex. *J Neurophysiol* 54: 479-490.
158. Ito M (1988) Response properties and topography of vibrissa-sensitive VPM neurons in the rat. *J Neurophysiol* 60: 1181-1197.
159. Ito M (1992) Simultaneous visualization of cortical barrels and horseradish peroxidase-injected layer 5b vibrissa neurones in the rat. *J Physiol* 454: 247-265.

160. Jablonska B, Gierdalski M, Siucinska E, Skangiel-Kramska J, Kossut M (1995) Partial blocking of NMDA receptors restricts plastic changes in adult mouse barrel cortex. *Behav Brain Res* 66: 207-216.
161. Jacquin MF, McCasland JS, Henderson TA, Rhoades RW, Woolsey TA (1993) 2-DG uptake patterns related to single vibrissae during exploratory behaviors in the hamster trigeminal system. *J Comp Neurol* 332: 38-58.
162. Jeanmonod D, Rice FL, Van der LH (1981) Mouse somatosensory cortex: alterations in the barrelfield following receptor injury at different early postnatal ages. *Neuroscience* 6: 1503-1535.
163. Jensen KF, Killackey HP (1987) Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. I. The normal morphology of specific thalamocortical afferents. *J Neurosci* 7: 3529-3543.
164. Jhaveri S, Erzurumlu RS, Crossin K (1991) Barrel construction in rodent neocortex: role of thalamic afferents versus extracellular matrix molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4489-4493.
165. Johnson LJ, Hanley DF, Thakor NV (2000) Optical light scatter imaging of cellular and sub-cellular morphology changes in stressed rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods* 98: 21-31.
166. Jonas P, Spruston N (1994) Mechanisms shaping glutamate-mediated excitatory postsynaptic currents in the CNS. *Curr Opin Neurobiol* 4: 366-372.
167. Jones EG (1993) GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex* 3: 361-372.
168. Kano M, Iino K, Kano M (1991) Functional reorganization of adult cat somatosensory cortex is dependent on NMDA receptors. *Neuroreport* 2: 77-80.
169. Katz LC (1987) Local circuitry of identified projection neurons in cat visual cortex brain slices. *J Neurosci* 7: 1223-1249.
170. Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-1138.
171. Keller A (1993) Intrinsic synaptic organization of the motor cortex. *Cereb Cortex* 3: 430-441.
172. Keller A, White EL (1989) Triads: a synaptic network component in the cerebral cortex. *Brain Res* 496: 105-112.
173. Killackey HP, Belford GR (1980) Central correlates of peripheral pattern alterations in the trigeminal system of the rat. *Brain Res* 183: 205-210.
174. Killackey HP, Koralek KA, Chiaia NL, Rhodes RW (1989) Laminar and areal differences in the origin of the subcortical projection neurons of the rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 282: 428-445.
175. Killackey HP, Rhoades RW, Bennett-Clarke CA (1995) The formation of a cortical somatotopic map. *Trends Neurosci* 18: 402-407.
176. Kim U, Ebner FF (1999) Barrels and septa: separate circuits in rat barrels field cortex. *J Comp Neurol* 408: 489-505.

177. Kirkwood A, Rioult MC, Bear MF (1996) Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex. *Nature* 381: 526-528.
178. Kleinfeld D, Berg RW, O'Connor SM (1999) Anatomical loops and their electrical dynamics in relation to whisking by rat. *Somatosens Mot Res* 16: 69-88.
179. Klintsova AY, Greenough WT (1999) Synaptic plasticity in cortical systems. *Curr Opin Neurobiol* 9: 203-208.
180. Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E (2002) Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* 34: 265-273.
181. Kohn A, Metz C, Quibrera M, Tommerdahl MA, Whitsel BL (2000) Functional neocortical microcircuitry demonstrated with intrinsic signal optical imaging in vitro. *Neuroscience* 95: 51-62.
182. Kohn A, Pinheiro A, Tommerdahl MA, Whitsel BL (1997) Optical imaging in vitro provides evidence for the minicolumnar nature of cortical response. *Neuroreport* 8: 3513-3518.
183. Komatsu Y, Nakajima S, Toyama K, Fetz, EE. (1988) Intracortical connectivity revealed by spike-triggered averaging in slice preparations of cat visual cortex. *Brain Research* 442: 359-362.
184. Koralek KA, Jensen KF, Killackey HP (1988) Evidence for two complementary patterns of thalamic input to the rat somatosensory cortex. *Brain Res* 463: 346-351.
185. Kossut M (1985) Effects of sensory denervation and deprivation on a single cortical vibrissal column studied with 2-deoxyglucose. *Physiol Bohemoslov* 34 Suppl: 79-83.
186. Kossut M (1988) Modifications of the single cortical vibrissal column. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 48: 83-115.
187. Kossut M (1992) Plasticity of the barrel cortex neurons. *Prog Neurobiol* 39: 389-422.
188. Kossut M (1998) Experience-dependent changes in function and anatomy of adult barrel cortex. *Exp Brain Res* 123: 110-116.
189. Kossut M, Juliano SL (1999) Anatomical correlates of representational map reorganization induced by partial vibrissotomy in the barrel cortex of adult mice. *Neuroscience* 92: 807-817.
190. Kossut M, Stewart MG, Siucinska E, Bourne RC, Gabbott PL (1991) Loss of gamma-aminobutyric acid (GABA) immunoreactivity from mouse first somatosensory (SI) cortex following neonatal, but not adult, denervation. *Brain Res* 538: 165-170.
191. Kötter R, Staiger JF, Zilles K, Luhmann HJ (1998) Analysing functional connectivity in brain slices by a combination of infrared video microscopy, flash photolysis of caged compounds and scanning methods. *Neuroscience* 86: 265-277.
192. Kreisman NR, LaManna JC, Liao SC, Yeh ER, Alcalá JR (1995) Light transmittance as an index of cell volume in hippocampal slices: optical differences of interfaced and submerged positions. *Brain Res* 693: 179-186.

193. Kriegstein AR, Suppes T, Prince DA (1987) Cellular and synaptic physiology and epileptogenesis of developing rat neocortical neurons in vitro. *Brain Res* 431: 161-171.
194. Kyriazi HT, Carvell GE, Brumberg JC, Simons DJ (1996a) Effects of baclofen and phaclofen on receptive field properties of rat whisker barrel neurons. *Brain Res* 712: 325-328.
195. Kyriazi HT, Carvell GE, Brumberg JC, Simons DJ (1996b) Quantitative effects of GABA and bicuculline methiodide on receptive field properties of neurons in real and simulated whisker barrels. *J Neurophysiol* 75: 547-560.
196. Kyriazi HT, Simons DJ (1993) Thalamocortical response transformations in simulated whisker barrels. *J Neurosci* 13: 1601-1615.
197. Laaris N, Carlson GC, Keller A (2000) Thalamic-evoked synaptic interactions in barrel cortex revealed by optical imaging. *J Neurosci* 20: 1529-1537.
198. Laaris N, Keller A (2002) Functional independence of layer IV barrels. *J Neurophysiol* 87: 1028-1034.
199. Land PW, Buffer SA, Jr., Yaskosky JD (1995) Barreloids in adult rat thalamus: three-dimensional architecture and relationship to somatosensory cortical barrels. *J Comp Neurol* 355: 573-588.
200. Land PW, Simons DJ (1985a) Cytochrome oxidase staining in the rat SmI barrel cortex. *J Comp Neurol* 238: 225-235.
201. Land PW, Simons DJ (1985b) Metabolic activity in SmI cortical barrels of adult rats is dependent on patterned sensory stimulation of the mystacial vibrissae. *Brain Res* 341: 189-194.
202. Land PW, Simons DJ (1985c) Metabolic and structural correlates of the vibrissae representation in the thalamus of the adult rat. *Neurosci Lett* 60: 319-324.
203. Langdon RB, Sur M (1992) The effects of selective glutamate receptor antagonists on synchronized firing bursts in layer III of rat visual cortex. *Brain Res* 599: 283-296.
204. Larkman A, Mason A (1990) Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. I. Establishment of cell classes. *J Neurosci* 10: 1407-1414.
205. Larkman AU (1991) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *J Comp Neurol* 306: 332-343.
206. Larkum ME, Zhu JJ, Sakmann B (1999) A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers. *Nature* 398: 338-341.
207. Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K (2000) Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404: 876-881.
208. Leslie MJ, Bennett-Clarke CA, Rhoades RW (1992) Serotonin 1B receptors form a transient vibrissa-related pattern in the primary somatosensory cortex of the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res* 69: 143-148.

209. Levin BE, Dunn-Meynell A (1991) Adult rat barrel cortex plasticity occurs at 1 week but not at 1 day after vibrissotomy as demonstrated by the 2-deoxyglucose method. *Exp Neurol* 113: 237-248.
210. Lichtenstein SH, Carvell GE, Simons DJ (1990) Responses of rat trigeminal ganglion neurons to movements of vibrissae in different directions. *Somatosens Mot Res* 7: 47-65.
211. Lisman J (1989) A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9574-9578.
212. Lisman JE, Goldring MA (1988) Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5320-5324.
213. Lorente de Nó (1938) Architectonics and structure of the cerebral cortex. In: *Physiology of the nervous system* (Fulton J F, ed), pp 291-327. London: Oxford University Press.
214. LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15: 1287-1298.
215. Lu SM, Lin RC (1993) Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light- and electron-microscopic study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens Mot Res* 10: 1-16.
216. Lubke J, Egger V, Sakmann B, Feldmeyer D (2000) Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *J Neurosci* 20: 5300-5311.
217. Luhmann HJ, Prince DA (1991) Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol* 65: 247-263.
218. Ma PM (1991) The barrelettes--architectonic vibrissal representations in the brainstem trigeminal complex of the mouse. I. Normal structural organization. *J Comp Neurol* 309: 161-199.
219. MacVicar BA (1984) Infrared video microscopy to visualize neurons in the in vitro brain slice preparation. *J Neurosci Methods* 12: 133-139.
220. MacVicar BA, Hochman D (1991) Imaging of synaptically evoked intrinsic optical signals in hippocampal slices. *J Neurosci* 11: 1458-1469.
221. Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283: 1923-1927.
222. Malinow R (1991) Transmission between pairs of hippocampal slice neurons: quantal levels, oscillations, and LTP. *Science* 252: 722-724.
223. Markram H (1997) A network of tufted layer 5 pyramidal neurons. *Cereb Cortex* 7: 523-533.
224. Markram H, Lubke J, Frotscher M, Roth A, Sakmann B (1997) Physiology and anatomy of synaptic connections between thick tufted pyramidal neurones in the developing rat neocortex. *J Physiol* 500 ( Pt 2): 409-440.

225. Martin KA, Whitteridge D (1984) Form, function and intracortical projections of spiny neurones in the striate visual cortex of the cat. *J Physiol* 353: 463-504.
226. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261-263.
227. McCasland JS, Bernardo KL, Probst KL, Woolsey TA (1992) Cortical local circuit axons do not mature after early deafferentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1832-1836.
228. McCasland JS, Woolsey TA (1988) High-resolution 2-deoxyglucose mapping of functional cortical columns in mouse barrel cortex. *J Comp Neurol* 278: 555-569.
229. McCormick DA (1992) Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog Neurobiol* 39: 337-388.
230. McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol* 54: 782-806.
231. McCray JA, Trentham DR (1989) Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 18: 239-270.
232. McGuire BA, Gilbert CD, Rivlin PK, Wiesel TN (1991) Targets of horizontal connections in macaque primary visual cortex. *J Comp Neurol* 305: 370-392.
233. Micheva KD, Beaulieu C (1995) An anatomical substrate for experience-dependent plasticity of the rat barrel field cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11834-11838.
234. Micheva KD, Beaulieu C (1996) Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *J Comp Neurol* 373: 340-354.
235. Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV (1990) Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res* 24: 748-753.
236. Miller LP, Johnson AE, Gelhard RE, Insel TR (1990) The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain--II. Kainic acid receptors. *Neuroscience* 35: 45-51.
237. Miller SG, Kennedy MB (1986) Regulation of brain type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>-triggered molecular switch. *Cell* 44: 861-870.
238. Moore CI, Nelson SB (1998) Spatio-temporal subthreshold receptive fields in the vibrissa representation of rat primary somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 80: 2882-2892.
239. Moore CI, Nelson SB, Sur M (1999) Dynamics of neuronal processing in rat somatosensory cortex. *Trends Neurosci* 22: 513-520.
240. Mountcastle VB (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20.

241. Mountcastle VB (1978) Brain mechanisms for directed attention. *J R Soc Med* 71: 14-28.
242. Mountcastle VB (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 ( Pt 4): 701-722.
243. Muller M, Somjen GG (1999) Intrinsic optical signals in rat hippocampal slices during hypoxia-induced spreading depression-like depolarization. *J Neurophysiol* 82: 1818-1831.
244. Neher E, Sakmann B, Steinbach JH (1978) The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* 375: 219-228.
245. Nelson DA, Katz LC (1995) Emergence of functional circuits in ferret visual cortex visualized by optical imaging. *Neuron* 15: 23-34.
246. Newman EA (1993) Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* 13: 3333-3345.
247. Nicolelis MA, Chapin JK, Lin CS (1991) Ontogeny of corticocortical projections of the rat somatosensory cortex. *Somatosens Mot Res* 8: 193-200.
248. Nicolelis MAL, Baccala LA, Lin RCS, Chapin JK (1995) Sensorimotor Encoding by Synchronous Neural Ensemble Activity at Multiple Levels of the Somatosensory System. *Science* 268: 1353-1358.
249. Nicoll A, Blakemore C (1993) Single-fibre EPSPs in layer 5 of rat visual cortex in vitro. *Neuroreport* 4: 167-170.
250. Nishigori A, Tsumoto T, Kimura F (1990) Contribution of quisqualate/kainate and NMDA receptors to excitatory synaptic transmission in the rat's visual cortex. *Vis Neurosci* 5: 591-604.
251. Nothias F, Peschanski M, Besson JM (1988) Somatotopic reciprocal connections between the somatosensory cortex and the thalamic Po nucleus in the rat. *Brain Res* 447: 169-174.
252. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-465.
253. O'Connor SM, Berg RW, Kleinfeld D (2002) Coherent electrical activity between vibrissa sensory areas of cerebellum and neocortex is enhanced during free whisking. *Journal of Neurophysiology* 87: 2137-2148.
254. O'Leary DD, Ruff NL, Dyck RH (1994) Development, critical period plasticity, and adult reorganizations of mammalian somatosensory systems. *Curr Opin Neurobiol* 4: 535-544.
255. Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58: 299-327.
256. Patel U (1983) Non-random distribution of blood vessels in the posterior region of the rat somatosensory cortex. *Brain Res* 289: 65-70.

257. Patel-Vaidya U (1985) Ultrastructural organization of posterior and anterior barrels in the somatosensory cortex of rat. *J Neurosci Res* 14: 357-371.
258. Peters A, Palay SL, Webster HD (1991) The fine structure of the nervous system: Neurons and their supporting cells. Oxford University Press, London.
259. Peters A, Sethares C (1991) Organization of pyramidal neurons in area 17 of monkey visual cortex. *J Comp Neurol* 306: 1-23.
260. Peters A, Yilmaz E (1993) Neuronal organization in area 17 of cat visual cortex. *Cereb Cortex* 3: 49-68.
261. Petersen CC, Sakmann B (2000) The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex. *J Neurosci* 20: 7579-7586.
262. Petersen CC, Sakmann B (2001) Functionally independent columns of rat somatosensory barrel cortex revealed with voltage-sensitive dye imaging. *J Neurosci* 21: 8435-8446.
263. Peterson BE, Goldreich D, Merzenich MM (1998) Optical imaging and electrophysiology of rat barrel cortex. I. Responses to small single-vibrissa deflections. *Cereb Cortex* 8: 173-183.
264. Pettit DL, Wang SS, Gee KR, Augustine GJ (1997) Chemical two-photon uncaging: a novel approach to mapping glutamate receptors. *Neuron* 19: 465-471.
265. Powell TPS, Mountcastle VB (1959) Some Aspects of the Functional Organization of the Cortex of the Postcentral Gyrus of the Monkey - A Correlation of Findings Obtained in A Single Unit Analysis with Cytoarchitecture. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 105: 133-162.
266. Ransom BR, Yamate CL, Connors BW (1985) Activity-dependent shrinkage of extracellular space in rat optic nerve: a developmental study. *J Neurosci* 5: 532-535.
267. Rausell E, Jones EG (1995) Extent of intracortical arborization of thalamocortical axons as a determinant of representational plasticity in monkey somatic sensory cortex. *J Neurosci* 15: 4270-4288.
268. Rema V, Armstrong-James M, Ebner FF (1998) Experience-dependent plasticity of adult rat S1 cortex requires local NMDA receptor activation. *J Neurosci* 18: 10196-10206.
269. Reyes A, Sakmann B (1999) Developmental switch in the short-term modification of unitary EPSPs evoked in layer 2/3 and layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex. *J Neurosci* 19: 3827-3835.
270. Rice FL, Van der LH (1977) Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse. *J Comp Neurol* 171: 545-560.
271. Riddle D, Richards A, Zsuppan F, Purves D (1992) Growth of the rat somatic sensory cortex and its constituent parts during postnatal development. *J Neurosci* 12: 3509-3524.
272. Rockel AJ, Hiorns RW, Powell TP (1980) The basic uniformity in structure of the neocortex. *Brain* 103: 221-244.

273. Sachdev RNS, Sato T, Ebner FF (2002) Divergent movement of adjacent whiskers. *Journal of Neurophysiology* 87: 1440-1448.
274. Sadaka Y, Lev DL, Weinfeld L, White EL (2000) Effects of sensory deprivation on the development of asymmetrical synapses in mouse barrels. *Somatosens Mot Res* 17: 245-254.
275. Sales N, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1989) Ontogeny of dopaminergic D-2 receptors in the rat nervous system: characterization and detailed autoradiographic mapping with [<sup>125</sup>I]iodosulpride. *Neuroscience* 28: 673-700.
276. Sato H, Hata Y, Masui H, Tsumoto T (1987) A functional role of cholinergic innervation to neurons in the cat visual cortex. *J Neurophysiol* 58: 765-780.
277. Schlaggar BL, Fox K, O'Leary DD (1993) Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex. *Nature* 364: 623-626.
278. Schubert D, Staiger JF, Cho N, Kötter R, Zilles K, Luhmann HJ (2001) Layer-specific intracolumnar and transcolumnar functional connectivity of layer V pyramidal cells in rat barrel cortex. *J Neurosci* 21: 3580-3592.
279. Schuz A, Palm G (1989) Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. *J Comp Neurol* 286: 442-455.
280. Senft SL, Woolsey TA (1991) Computer-aided analyses of thalamocortical afferent ingrowth. *Cereb Cortex* 1: 336-347.
281. Senft SL, Woolsey TA (1991) Growth of thalamic afferents into mouse barrel cortex. *Cereb Cortex* 1: 308-335.
282. Sheperd GM (1990) *The Synaptic Organization of the Brain*. New York: Oxford University Press.
283. Shepherd G.M.P, Pologruto T.A., and Svoboda K. (2002) Experience-dependent organization of inputs to layer 2/3 cells in barrel cortex. *Neuroscience Abstract* .
284. Sherman SM, Guillery RW (1996) Functional organization of thalamocortical relays. *J Neurophysiol* 76: 1367-1395.
285. Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R (1999) Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284: 1811-1816.
286. Simons DJ (1978) Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J Neurophysiol* 41: 798-820.
287. Simons DJ (1983) Multi-whisker stimulation and its effects on vibrissa units in rat SmI barrel cortex. *Brain Res* 276: 178-182.
288. Simons DJ (1985) Temporal and spatial integration in the rat SI vibrissa cortex. *J Neurophysiol* 54: 615-635.
289. Simons DJ, Carvell GE (1989) Thalamocortical response transformation in the rat vibrissa/barrel system. *J Neurophysiol* 61: 311-330.

290. Simons DJ, Carvell GE, Hershey AE, Bryant DP (1992) Responses of barrel cortex neurons in awake rats and effects of urethane anesthesia. *Exp Brain Res* 91: 259-272.
291. Simons DJ, Land PW (1987) Early experience of tactile stimulation influences organization of somatic sensory cortex. *Nature* 326: 694-697.
292. Simons DJ, Woolsey TA (1979) Functional organization in mouse barrel cortex. *Brain Res* 165: 327-332.
293. Simons DJ, Woolsey TA (1984) Morphology of Golgi-Cox-impregnated barrel neurons in rat SmI cortex. *J Comp Neurol* 230: 119-132.
294. Skibinska A, Glazewski S, Fox K, Kossut M (2000) Age-dependent response of the mouse barrel cortex to sensory deprivation: a 2-deoxyglucose study. *Exp Brain Res* 132: 134-138.
295. Smith R.L. (1980) The ascending fibre projections from the principal sensory trigeminal nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 148: 423-446.
296. Somogyi P, Nunzi MG, Gorio A, Smith AD (1983) A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res* 259: 137-142.
297. Staiger JF, Kötter R, Zilles K, Luhmann HJ (2000) Laminar characteristics of functional connectivity in rat barrel cortex revealed by stimulation with caged-glutamate. *Neurosci Res* 37: 49-58.
298. Stern EA, Maravall M, Svoboda K (2001) Rapid development and plasticity of layer 2/3 maps in rat barrel cortex in vivo. *Neuron* 31: 305-315.
299. Stratford KJ, Tarczy-Hornoch K, Martin KA, Bannister NJ, Jack JJ (1996) Excitatory synaptic inputs to spiny stellate cells in cat visual cortex. *Nature* 382: 258-261.
300. Stuart G, Sakmann B (1995) Amplification of Epsps by Axosomatic Sodium-Channels in Neocortical Pyramidal Neurons. *Neuron* 15: 1065-1076.
301. Stuart G, Spruston N (1998) Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J Neurosci* 18: 3501-3510.
302. Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993a) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch* 423: 511-518.
303. Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993b) Patch-Clamp Recordings from the Soma and Dendrites of Neurons in Brain-Slices Using Infrared Video Microscopy. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 423: 511-518.
304. Stuart GJ, Sakmann B (1994) Active Propagation of Somatic Action-Potentials Into Neocortical Pyramidal Cell Dendrites. *Nature* 367: 69-72.
305. Sugitani M, Yano J, Sugai T, Ooyama H (1990) Somatotopic organization and columnar structure of vibrissae representation in the rat ventrobasal complex. *Exp Brain Res* 81: 346-352.

306. Sutor B, Hablitz JJ (1989) EPSPs in rat neocortical neurons in vitro. II. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in the generation of EPSPs. *J Neurophysiol* 61: 621-634.
307. Sutor B, Luhmann HJ (1995) Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. *Perspect Dev Neurobiol* 2: 409-419.
308. Svaasand LO, Ellingsen R (1983) Optical properties of human brain. *Photochem Photobiol* 38: 293-299.
309. Szentagothai J (1978) The Ferrier Lecture, 1977. The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation. *Proc R Soc Lond Biol Sci* 201: 219-248.
310. Tao L (2000) Light scattering in brain slices measured with a photon counting fiber optic system. *J Neurosci Methods* 101: 19-29.
311. Tasker JG, Dudek FE (1991) Electrophysiology of GABA-mediated synaptic transmission and possible roles in epilepsy. *Neurochem Res* 16: 251-262.
312. Thomson AM (1986) A magnesium-sensitive post-synaptic potential in rat cerebral cortex resembles neuronal responses to NMDA. *J Physiol* 370: 531-549.
313. Thomson AM, Bannister AP (1998) Postsynaptic pyramidal target selection by descending layer III pyramidal axons: dual intracellular recordings and biocytin filling in slices of rat neocortex. *Neuroscience* 84: 669-683.
314. Thomson AM, Deuchars J (1997) Synaptic interactions in neocortical local circuits: dual intracellular recordings in vitro. *Cereb Cortex* 7: 510-522.
315. Thomson AM, Deuchars J, West DC (1993) Single axon excitatory postsynaptic potentials in neocortical interneurons exhibit pronounced paired pulse facilitation. *Neuroscience* 54: 347-360.
316. Thomson AM, Deuchars J, West DC (1996) Neocortical local synaptic circuitry revealed with dual intracellular recordings and biocytin-filling. *J Physiol Paris* 90: 211-215.
317. Thomson AM, Girdlestone D, West DC (1989) A local circuit neocortical synapse that operates via both NMDA and non-NMDA receptors. *Br J Pharmacol* 96: 406-408.
318. Thomson AM, West DC, Lodge D (1985) An N-methylaspartate receptor-mediated synapse in rat cerebral cortex: a site of action of ketamine? *Nature* 313: 479-481.
319. Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402: 421-425.
320. Toth LJ, Rao SC, Kim DS, Somers D, Sur M (1996) Subthreshold facilitation and suppression in primary visual cortex revealed by intrinsic signal imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9869-9874.
321. Van der LH (1976) Neuronal circuitry and its development. *Prog Brain Res* 45: 259-278.
322. Van der LH, Woolsey TA (1973) Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. *Science* 179: 395-398.

323. Van Eden CG, Kros JM, Uylings HB (1990) The development of the rat prefrontal cortex. Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas. *Prog Brain Res* 85: 169-183.
324. Veas AM, Micheva KD, Beaulieu C, Descarries L (1998) Increased number and size of dendritic spines in ipsilateral barrel field cortex following unilateral whisker trimming in postnatal rat. *J Comp Neurol* 400: 110-124.
325. Wallace H, Fox K (1999a) Local cortical interactions determine the form of cortical plasticity. *J Neurobiol* 41: 58-63.
326. Wallace H, Fox K (1999b) The effect of vibrissa deprivation pattern on the form of plasticity induced in rat barrel cortex. *Somatosens Mot Res* 16: 122-138.
327. Wallace H, Glazewski S, Liming K, Fox K (2001) The role of cortical activity in experience-dependent potentiation and depression of sensory responses in rat barrel cortex. *J Neurosci* 21: 3881-3894.
328. Wallace MN (1987) Histochemical demonstration of sensory maps in the rat and mouse cerebral cortex. *Brain Res* 418: 178-182.
329. Wang SS, Augustine GJ (1995) Confocal imaging and local photolysis of caged compounds: dual probes of synaptic function. *Neuron* 15: 755-760.
330. Weliky M, Katz LC (1994) Functional mapping of horizontal connections in developing ferret visual cortex: experiments and modeling. *J Neurosci* 14: 7291-7305.
331. Welker C (1971) Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (SmI) cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res* 26: 259-275.
332. Welker C, Woolsey TA (1974) Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *J Comp Neurol* 158: 437-453.
333. Welker E, Armstrong-James M, Van der LH, Kraftsik R (1993) The mode of activation of a barrel column: response properties of single units in the somatosensory cortex of the mouse upon whisker deflection. *Eur J Neurosci* 5: 691-712.
334. Welker E, Hoogland PV, Van der LH (1988) Organization of feedback and feedforward projections of the barrel cortex: a PHA-L study in the mouse. *Exp Brain Res* 73: 411-435.
335. Welker E, Rao SB, Dörfl J, Melzer P, Van der LH (1992) Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: effects of chronic stimulation upon deoxyglucose uptake in the behaving animal. *J Neurosci* 12: 153-170.
336. Welker WI (1964) Analysis of sniffing in the albino rat. *Behaviour* 22: 223-244.
337. Weller WL, Johnson JI (1975) Barrels in cerebral cortex altered by receptor disruption in newborn, but not in five-day-old mice (*Cricetidae* and *Muridae*). *Brain Res* 83: 504-508.
338. White EL (1976) Ultrastructure and synaptic contacts in barrels of mouse SI cortex. *Brain Res* 105: 229-251.
339. White EL (1989) *Cortical Circuits: Synaptic organization of the cerebral cortex - Structure, function and theory*. Boston: Birkhäuser.

340. White EL, Peters A (1993) Cortical modules in the posteromedial barrel subfield (Sml) of the mouse. *J Comp Neurol* 334: 86-96.
341. Wieboldt R, Gee KR, Niu L, Ramesh D, Carpenter BK, Hess GP (1994) Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8752-8756.
342. Williams MN, Zahm DS, Jacquin MF (1994) Differential foci and synaptic organization of the principal and spinal trigeminal projections to the thalamus in the rat. *Eur J Neurosci* 6: 429-453.
343. Wineski LE (1983) Movements of the Cranial Vibrissae in the Golden-Hamster (*Mesocricetus-Auratus*). *Journal of Zoology* 200: 261-280.
344. Wise SP, Jones EG (1978) Developmental studies of thalamocortical and commissural connections in the rat somatic sensory cortex. *J Comp Neurol* 178: 187-208.
345. Witte OW, Niermann H, Holthoff K (2001) Cell swelling and ion redistribution assessed with intrinsic optical signals. *An Acad Bras Cienc* 73: 337-350.
346. Woolsey TA (1990) Peripheral alteration and somatosensory development. Development of sensory systems in mammals. New York: Wiley.
347. Woolsey TA (1996) Barrels: 25 years later. *Somatosens Mot Res* 13: 181-186.
348. Woolsey TA, Van der LH (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17: 205-242.
349. Woolsey TA, Wann JR (1976) Areal changes in mouse cortical barrels following vibrissal damage at different postnatal ages. *J Comp Neurol* 170: 53-66.
350. Woolsey TA, Welker C, Schwartz RH (1975) Comparative Anatomical Studies of Sml Face Cortex with Special Reference to Occurrence of Barrels in Layer-4. *Journal of Comparative Neurology* 164: 79-94.
351. Yuste R, Katz LC (1991) Control of postsynaptic Ca<sup>2+</sup> influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 6: 333-344.
352. Yuste R, Peinado A, Katz LC (1992) Neuronal domains in developing neocortex. *Science* 257: 665-669.
353. Zhu JJ, Connors BW (1999) Intrinsic firing patterns and whisker-evoked synaptic responses of neurons in the rat barrel cortex. *J Neurophysiol* 81: 1171-1183.
354. Zito K, Svoboda K (2002) Activity-dependent synaptogenesis in the adult Mammalian cortex. *Neuron* 35: 1015-1017.
355. Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17: 91-102.

## 6.2 Abkürzungen

ACSF	Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit ("artificial cerebrospinal fluid")
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AP	Aktionspotential
CGP35348	p-(3-Aminopropyl)-P-diethoxymethylphosphinsäure
CNB	Carboxy-2-nitrobenzyl
D-APV	D(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure
d	Durchmesser
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
FS-Komplex	Follikel-Sinus-Komplex
GABA	$\gamma$ -Aminobutyrat
GC	Gradientenkontrast
h	Barrel-Höhle
IB	„intrinsically bursting“
IOS	Intrinsisch optisches Signal
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
IR	Infrarot
L	Lamina
L* $\rightarrow$ L*	Projektion von Lamina* nach Lamina*
LTD	Langzeitdepression ("long-term depression")
LTP	Langzeitpotenzierung ("long-term potentiation")
N.A.	Numerische Apertur
NBQX	6-Nitro-7-sulphamoyl-benz(f)quinoxalin-2,3-dion
NMDA	N-methyl-D-aspartat
PMBSF	posteromedial barrel subfield
PND	postnataler Tag
POm	Nucleus posterior thalami pars medialis
PrV	Nucleus principalis
PSP	postsynaptisches Potential
RF	Rezeptives Feld
RMP	Ruhemembranpotential
RN	Eingangswiderstand
RS	„regularly spiking“
s	Barrel-Seite
SI	primärer somatosensorischer Kortex
SII	sekundärer somatosensorischer Kortex
S.E.M.	Standardfehler ("standard error of the mean")
Sig.	Signifikanz
SpVc	Nucleus spinalis caudalis
SpVi	Nucleus spinalis interpolaris
SpVo	Nucleus spinalis oralis
UV	Ultraviolett
Vm	Membranpotential
VPM	Nucleus ventralis posterior thalami pars medialis
ZNS	Zentrales Nervensystem

### 6.3 Verwendete Substanzen

(CNB-caged) Glutamat	0,25-0,5mM	Molecular Probes
CaCl <sub>2</sub>	2mM	Merck
CGP35348	200µM	Ciba-Geigy
D-APV	50µM	Tocris
EGTA	0,5mM	Merck
Glucose	5 - 25mM	Merck
HEPES	10 mM	Biomol
KCl	2,5 - 5mM	Merck
K-Gluconat	130nM	Fluka
KOH	1M	Merck
Mg-ATP	2mM	Sigma
MgCl <sub>2</sub>	1 - 4mM	Merck
NaCl	125mM	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25mM	Merck
NaHCO <sub>3</sub>	25mM	Merck
NBQX	0,8µM	Tocris
Picrotoxin	75µM	Sigma

## 6.4 Curriculum vitae

<b>Name</b>	Anja Schierloh
<b>Geburtstag, -ort</b>	02.02.1972 in Ehingen / Donau
<b>Eltern</b>	Karl-Heinz Schierloh, Waltraud Schierloh, geb. Seiffert
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Ausbildung</b>	
Schulbildung:	1978 - 1982 Grundschule Buch 1982 - 1983 Gymnasiales Kolleg der Schulbrüder, Illertissen 1983 - 1991 Gymnasium Ehingen Abschluss des Gymnasiums mit der allgemeinen Hochschulreife
Universität:	Diplomstudiengang Biologie (Hauptfach Zoologie) WS 1991/92 – SS 1992 Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt / Main WS 1992/93 – SS 1996 Universität Regensburg Diplomprüfung WS 1996/97 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie Juli 1997 – März 1998 Titel „Morphologische und elektrophysiologische Untersuchungen der Afferenzen des <i>High Vocal Center</i> (HVC) beim Zebrafinken“
Promotion am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, Abteilung Klinische Neuropharmakologie: seit April 1999	

## 6.5 Eigene Arbeiten

### 1.) Zeitschriftenbeiträge

Dodt HU, Eder M, Schierloh A, Zieglgänsberger W (2002) Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices. *Sci STKE* 2002: L2.

Dodt HU, Schierloh A, Eder M, Zieglgänsberger W (2003) Circuitry of rat barrel cortex investigated by infrared-guided laser stimulation. *Neuroreport* 14: 623-627.

*In Press:*

Eder M, Becker K, Rammes G, Schierloh A, Azad SC, Zieglgänsberger W, Dodt HU (2003) Distribution and properties of functional postsynaptic kainate receptors on neocortical layer V neurons.

*Zur Publikation eingereicht:*

Schierloh A, Eder M, Zieglgänsberger W, Dodt HU (2003) Effects of sensory deprivation on the circuitry of rat barrel cortex. *Neuroreport*

### 2.) Diplomarbeit

Schierloh A (1998). Morphologische und elektrophysiologische Untersuchung der Afferenzen des High Vocal Center (HVC) beim Zebrafinken. Universität Regensburg. Diplomarbeit.

### 3.) Konferenzbeiträge

Schierloh A, Eder M, Zieglgänsberger W und Dodt H-U (2000). Circuitry of rat barrel cortex investigated by infrared-guided laserstimulation. *Synapses 2000*, München.

Schierloh A, Eder M, Zieglgänsberger W und Dodt H-U (2000). Circuitry of rat barrel cortex investigated by infrared-guided laserstimulation. *Society for Neuroscience. Abstracts.*

Schierloh A, Eder M, Zieglgänsberger W und Dodt H-U (2001). Circuitry of rat barrel cortex investigated by infrared-guided laserstimulation. *Deutsche Physiologentagung, Berlin. Pflüglers Archiv. Europ J Physiol Suppl.*

Schierloh A, Eder M, Zieglgänsberger W und Dodt H-U (2001). Circuitry of rat barrel cortex investigated by infrared-guided laserstimulation. *Neurobiologentagung, Göttingen. Abstract in: Göttingen Neurobiology Report. Proceedings of the 28th Göttingen Neurobiology Conference.*

Schierloh A, Zieglgänsberger W und Dodt H-U (2001). Effects of deprivation on circuitry of rat barrel cortex. *Society for Neuroscience. Abstracts.*

Schierloh A, Zieglgänsberger W und Dodt H-U (2002). Effects of deprivation on circuitry of rat barrel cortex. *Deutsche Physiologentagung, Tübingen. Pflüglers Archiv.*

Becker K, Schierloh A, Eder M, Zieglgänsberger W, und Dodt H-U (2003). Modulation of the spread of excitation in single barrels in neocortical slices visualized by infrared-darkfield microscopy at high resolution. *Neurobiologentagung, Göttingen. Abstract in: Göttingen Neurobiology Report. Proceedings of the 30th Göttingen Neurobiology Conference.*

## 6.6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich herzlich Herrn Prof. Dr. W. Zieglgänsberger danken, der mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat. Neben seiner großzügigen Unterstützung danke ich ihm weiterhin für die stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. F. Holsboer bedanke ich mich für die Erlaubnis zur Nutzung sämtlicher Einrichtungen seines Hauses.

Herrn PD Dr. H.-U. Dodt danke ich für die Vergabe des Themas und die gute Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.J. Leppelsack möchte ich herzlich für die externe Betreuung, seine Anregungen, sein Interesse und seine Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Dr. A. Yassouridis danke ich sehr herzlich für die Unterstützung bezüglich statistischer Fragen.

Bei Frau C. Hilf und Frau B. Hauger bedanke ich mich für die technische Unterstützung. Allen Mitarbeitern der Abteilung Klinische Neuropharmakologie danke ich für die Hilfsbereitschaft und menschliche Atmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Matthias und Klaus – den besten Kollegen, die man sich wünschen kann! – die mir stets mit fachlichem Rat und motivierenden Worten zur Seite standen. Für zahlreiche wissenschaftliche sowie persönliche Gespräche möchte ich mich bei Ulli, Gerhard und Shanaz bedanken.

Meinen Mitbewohnern sowie Ralf, Silke und Dieter möchte ich dafür danken, dass sie mir den Rücken frei hielten und mich u.a. durch „kulinarische Motivassen“ und „Dogsitting“ unterstützten. Der letzte Dank gilt meiner Hündin Svenja, der geduldigsten Begleiterin meiner Doktorarbeit.

